

# Masteroppgave i Farmasi

---

## Indirekte påvisning av doping med veksthormon

av Stian Bremnes Ottersen



Faggruppen for legemiddelanalyse

Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Våren 201

Masteroppgave i legemiddelkjemi

Fagområde: Legemiddelanalyse

Indirekte påvisning av doping med veksthormon

Stian Bremnes Ottersen

Veiledere:

Overingeniør Yvette Dehnes

Norges laboratorium for dopinganalyse

Oslo Universitetssykehus, Aker

Prof. Dr. Peter Hemmersbach

Farmasøytisk Institutt/ Norges laboratorium for dopinganalyse

Oslo Universitetssykehus, Aker

Oppgaven ble utført ved:

Norges laboratorium for dopinganalyse

Oslo Universitetssykehus, Aker

## Forord

Jeg vil takke Norges laboratorium for dopinganalyser for et lærerikt og spennende år. Det har vært mange hyggelige samtaler ved lunsjbordet, på laben og på arrangementer.

En spesiell takk til mine veiledere Yvette Dehnes og Peter Hemmersbach.

Takk til Lillian og Kjersti for prøvetaking, takk også til Truls Raastad for prøveinnsamling ved NIH.

Takk til dere som frivillig stilte opp som kontrollgruppe, fra laboratoriet og blant venner.

Oslo, mai 2010

Stian B. Ottersen

## Innholdsfortegnelse

Forord .....	3
Innholdsfortegnelse .....	4
Forkortelser og ordforklaringer: .....	6
Sammendrag .....	8
1. Innledning .....	9
1.1. Dopingens historie: .....	9
1.1.1. Utviklingen av dopinganalyse for veksthormon: .....	11
1.1.2. Biologiske pass: .....	13
1.2 Veksthormon (GH): .....	13
1.2.1. Sekresjon av GH: .....	13
1.2.2. Farmakologi: .....	15
1.2.3. Effekter av GH: .....	15
1.3 Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): .....	16
1.3.1. Farmakologi og sekresjon av IGF-1: .....	16
1.3.2. Effekter av IGF-1: .....	17
1.4 Procollagen type III N-terminal peptide (PIIINP): .....	18
1.4.1. Farmakologi og sekresjon av PIIINP: .....	18
1.4.2. Effekter av PIIINP: .....	18
1.5 Bruk av stoffene i doping: .....	19
1.5.1. GH: .....	19
1.5.2. IGF-1: .....	20
1.6 Hensikt med oppgaven: .....	21
2. Eksperimentelt .....	22
2.1. Forsøkspersoner: .....	22
2.2. Gjennomføring av forsøket: .....	22
2.3. Utstyr brukt til analyse: .....	23
2.3.1. IGF-1: .....	23
2.3.2. PIIINP: .....	23
2.3.3. GH: .....	23
2.4. Validering: .....	25

3.	Resultater:.....	26
3.1.	Validering: .....	26
3.1.1.	IGF-1: .....	26
3.1.2.	PIIINP: .....	27
3.1.3.	GH: .....	27
3.2.	Analyseresultater: .....	29
3.2.1.	IGF-1 .....	29
3.2.2.	PIIINP: .....	31
3.2.3.	Tre forsøkspersoner med representativt standardavvik:.....	33
3.2.4.	Individuelle målinger: .....	35
3.2.5.	Individuelle profiler: .....	39
3.2.6.	Utviklingen av en dopingtest: .....	41
4.	Diskusjon:.....	42
4.1.	Mulige feilkilder: .....	42
4.2.	Prøvene: .....	43
4.2.1.	Styrkegruppen: .....	43
4.2.2.	Utholdenhetsgruppen: .....	43
4.2.3.	Brukergruppen:.....	44
4.2.4.	Normalbefolkning: .....	45
4.2.5.	Individuelle profiler: .....	45
4.3.	Utviklingen av en dopingtest: .....	46
4.3.1.	PIIINP / IGF-1 grafen: .....	46
4.3.2.	GH-2000:.....	47
5.	Konklusjon: .....	48
6.	Referanser: .....	49

## Forkortelser og ordforklaringer:

ADD	Anti Doping Danmark
ADN	Antidoping Norge
AGHD	adult growth hormone deficiency
ALS	acid labile subunit
BALCO	Bay Area Laboratory Co-Operative
CV %	relativt standardavvik prosent
DNA	Deoxyribonucleic acid
EPO	erythropoietin
FIS	Fédération Internationale de Ski
GH	growth hormone
GHRH	growth hormone releasing hormone
hGH	human growth hormone
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
ILMA	immunoluminometrisk assay
ILS	International Standard for Laboratories
IOC	International Olympic Committee
IU	internasjonal enhet
kDa	kilo Dalton
KKD	Kultur- og Kirkedepartementet
LH	luteiniserende hormon
LIA	Luminescent immunoassay
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantitation
Mean	gjennomsnitt

mg	milligram
ml	milliliter
ng	nanogram
nmol	nanomol
NIF	Norges idrettsforbund og olympiske og paralympiske Komité
NIH	Norges idretts høyskole
OL	De olympiske leker
PIIINP	procollagen type III N-terminal peptide
Pit	pituitary
Rec	recombinant
REK	Regional etisk komité
rhGH	recombinant human growth hormone
RIA	radioimmunoassay
SD	standardavvik
SS	somatostatin
$t_{1/2}$	halverings tid
$t_{max}$	tidspunkt for maksimal konsentrasjon i blodet etter stimuli eller tilførsel
TSH	tyreoideastimulerende hormon
UCI	Union Cycliste Internationale
U	unit
USA	United States of America
WADA	World Anti- Doping Agency
$\mu\text{g}$	mikrogram
$\mu\text{mol}$	mikromol

## Sammendrag

Veksthormondoping har blitt misbrukt innen idretten siden slutten av 1970- tallet. GH ble først omtalt i ”The Underground Steroid Handbook” som det mest kostbare og minst forståtte av de nye dopingmidlene. Selv om det er gjort mange studier på effektene av GH har få klart å bevise dens effekt som dopingmiddel, tiltross for dette er bruken antatt å være utbrett.

Deteksjon av GH har vært en stor utfordring siden det er et endogent stoff som må påvises i suprafysiologiske konsentrasjoner, halveringstiden til GH er kort i blodet, og det er store individuelle forskjeller. For å omgå disse forskjellene kan vi ta i bruk personlige profiler for markørene, der man fungerer som sin egen kontroll.

Hensikt med denne oppgaven var å måle konsentrasjonen av markørene IGF-1 og PIIINP i serum over tid fra fire ulike grupper. Gruppene består av en gruppe med brukere av dopingmidler og tre kontrollgrupper, fra to forskjellige typer idretter og en gruppe med normalbefolkning.

Vi har vist at det er til dels store forskjeller mellom forskjellige individer, i forhold til variasjonen sett for hver enkelt person. Ved å bruke flere prøver fra samme person har vi fremstilt individuelle profiler, der vi tydelig ser at profilene vil gjøre grenseområdene for markørene mindre enn ved å bruke grenseområder for en hel populasjon.

Denne studien vil fortsette ved Norges laboratorium for dopinganalyser etter at denne masteroppgaven er ferdig. Det vil bli spennende å se det endelige utfallet av studien når den blir fullført.



# 1. Innledning

## 1.1. Dopingens historie:

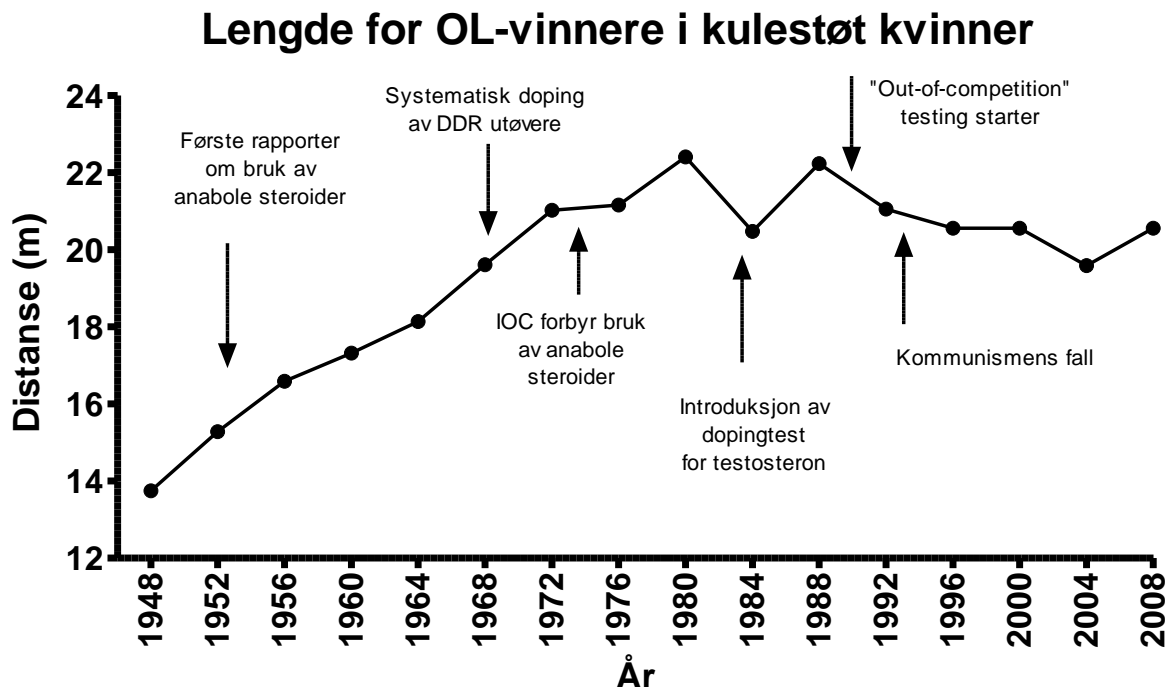
Ordet dop kommer fra Afrika der Zuluene lagde en alkoholisk drikk med forskjellige ekstrakter fra nøtter og planter. Drikken ble brukt for å få mot, styrke og utholdenhet når de skulle ut i kamp eller jakte. Historisk sett har doping vært brukt innen idrett siden man begynte å konkurrere. Man finner spor helt tilbake til Kina for 5000 år siden, der idrettsutøvere brukte planteekstrakter fra planten Efedra, som senere har fått navnet efedrin. Det er også dokumentasjon på bruk av forskjellig plante- og soppekstrakter blant idrettsutøvere i gamle Hellas, gladiatorene i Roma, aztekerne, inkaene, mongolene og blant berserkene her i Norge. [1, 2]

På slutten av 1800-tallet var doping brukt blant annet i hestesporten, der man dopet motstandernes hester for å gjøre dem dårligere. Kanalsvømmere brukte sukkerbiter dyppet i eter, koffein og alkohol for å styrke seg under den lange svømmeturen over kanalen. Utover 1900-tallet ble doping stadig mer brukt i ulike idretter, og det var stimulerende midler som koffein, kokain, stryknin, eter og alkohol som ble brukt. Under andre verdenskrig fikk soldater amfetamin for å dempe trettheten, dette førte i etterkant til at amfetamin bruken ble tatt med videre i det sivile liv etter krigen. I 1935 ble testosteron syntetisert, og bruken av anabole steroider innen idretten økte utover 1950-tallet. [1]

Etter flere episoder med dødsfall og økende bruk av dopingmidler, så de forskjellige internasjonale idrettsforbundene at de trengte et regelverk for å hindre dette. Det var det internasjonale sykkelforbundet (UCI) som først forbød doping og lagde et regelverk for dopingkontroll i 1960-årene. I 1963 formulerte Europarådet den første definisjonen av doping, som så ble tatt i bruk av Den internasjonale olympiske komité (IOC) under OL i Tokyo i 1964. Der hadde de for første gang dopingkontroll av utøverne. [1]

Et stort problem i starten av antidopingarbeidet var mangelen på testmetoder for å avsløre dopingmisbruket. Misbruket av steroider var utbredt og det var først i 1974 at man hadde en metode som kunne avsløre bruk av enkelte anabole steroider. I begynnelsen ble testing kun gjennomført ved store internasjonale konkurranser, men fra 1989 begynte man med uanmeldte "out-of-competition testing", som gjorde at man ikke kunne bruke doping i treningsperiodene for så å stoppe før konkurransene og dermed være "rene" til en eventuell

doping kontroll. Når disse metodene kom i bruk ble flere tatt for doping og når man ser tilbake på toppresultatene, spesielt i styrkeidrettene fra 1950 fram til i dag, har de blitt vesentlig dårligere etter at man kunne avsløre steroiddoping (figur 1). [1, 2]



Figur 1: Seiers distanse for kvinner i kulestøt under OL, med informasjon om hendelser som har påvirket lengden. [3]

På 70-tallet dukket også en ny form for doping opp, bloddoping. Metoden gikk da ut på å tappe blod, for senere å injisere det tilbake i utøveren. Dette ga en økt forekomst av oksygentransporterende hemoglobin og dermed økt ytelse. Bloddoping ble forbudt av IOC i 1986. Når bloddoping ble forbudt fant doperne en ny måte å oppnå den samme effekten på med erythropoietin (EPO). EPO ble forbudt av IOC i 1990, men ble brukt av utøvere siden det ikke fantes noen metode som kunne avsløre bruken. Først i 2000 til OL i Sydney hadde man kommet frem til en testmetode. [2]

Antidopingarbeidet har siden begynnelsen blitt drevet av IOC, internasjonale særforbund og myndigheter i enkelte land. Dette har ført til mange forskjellige definisjoner, og håndteringen av dopingsaker har vært ulike. For å få et bedre antidopingarbeid tok IOC i 1999 initiativet til "First World Conference on Doping in Sport". Ut fra arbeidet her ble "World Anti-Doping Agency" (WADA) stiftet 10. november 1999.[2]

I Norge har vi vært tidlig ute med antidopingarbeid. I 1971 vedtok Idrettstinget å ta avstand fra bruken av stimulerende midler, første dopingkontroll ble gjennomført 24. juni 1977, og i 1989 undertegnet Norge Europarådets antidopingkonvensjon. Hormonlaboratoriet ved Aker sykehus ble i 1988 akkreditert som dopinglaboratorium av IOC. Dopinglaboratoriet gjennomfører i dag ca 5500 analyser i året for Antidoping Norge (ADN), Anti Doping Danmark (ADD), WADA og flere andre oppdragsgivere. ADN ble opprettet i 2003 av Norges idrettsforbund og olympiske og paralympiske komité (NIF) og Kultur- og Kirkedepartementet (KKD). ADN er en uavhengig stiftelse som står for kontroll og påtalevirksomhet av dopingsaker uavhengig av NIF og staten.[1, 4]

### 1.1.1. Utviklingen av dopinganalyse for veksthormon:

Veksthormon (GH) har blitt misbrukt av idrettsutøvere siden slutten av 1970-tallet. GH ble forbudt av IOC i 1989 og er fortsatt på dopinglista til WADA [5]. Selv om det ble forbudt i 1989 hadde man ingen testmetode som kunne avsløre misbruket. Derfor ble det i 1996 satt sammen en gruppe (GH-2000) av internasjonale eksperter innen GH, som fram mot OL i Sydney 2000 skulle utvikle en testmetode for GH misbruk. De stod overfor flere utfordringer i utviklingen av en testmetode. GH er et endogent stoff som finnes naturlig i kroppen, derfor ville det ikke være nok å påvise stoffet i kroppen, men det måtte påvises i suprafysiologiske konsentrasjoner. GH sekreseres ikke jevnt i løpet av døgnet, men i uregelmessige pulser som påvirkes av blant annet stress og trening. Det er store individuelle forskjeller i hva som er vanlige konsentrasjoner i kroppen. GH konsentrasjonen i urin har ingen sammenheng med konsentrasjonen i blodet. For å løse disse utfordringene utførte gruppen flere ulike studier som skulle belyse problemet fra forskjellige sider. Etter tre år hadde de fullført de planlagte studiene og kommet frem til en analysemetode de mente, utover enhver tvil, ville kunne påvise misbruk av GH [6]. Denne metoden var basert på deteksjon i blod, ved hjelp av de indirekte markørene insulin-like growth factor 1 (IGF-1) og prokollagen type III N-terminal peptid (PIIINP). Disse markørene påvirkes direkte av GH konsentrasjonen i kroppen, og prokollagen type III N-terminal peptid endringer i konsentrasjon, på grunn av dopingmidler, kan påvises i mye lengre tid enn GH direkte. Etter et møte i 1999 der flere internasjonale eksperter skulle vurdere metoden, ble det konkludert med at metoden måtte valideres ytterligere før den kunne tas i bruk internasjonalt. Hovedpunktene i det som måtte undersøkes nøyere var mulige forskjeller mellom etniske grupper og påvirkningen av skade på

konsentrasjonen av markørene. Det ble nedsatt en ny gruppe, GH-2004, som fikk som oppgave å undersøke disse hovedpunktene og validere metoden ytterligere så metoden skulle være klar til bruk innen OL i Athen 2004 [7].

GH-2004 gruppen har ikke sluttført sine studier ennå, men noen av delstudiene er publisert. Så langt har de funnet ut at ulike etniske grupper ikke påvirker resultatet av GH-2000 metoden [8], og skade fører til en økning i PIIINP konsentrasjonen, men denne økningen er ikke nok til å gi noen falske positive [9].

Parallelt med GH-2000 og GH-2004 sine studier på indirekte markører, ble det også utviklet en direkte metode av Christian Strasburger og Martin Bidlingmaier i Tyskland. Denne metoden baserer seg på at GH finnes i flere ulike isoformer i kroppen, mens rekombinant GH kun består av 22 kDa isoformen. Forholdet mellom endogen 22 kDa GH og de andre isoformene er forholdsvis stabilt, og en stor økning i dette forholdet indikerer derfor inntak av rekombinant 22 kDa GH. Direktemetoden benytter to ulike antistoff til å måle serumkonsentrasjonen av de ulike formene, der det ene antistoffet gjenkjenner 22 kDa isoformen og det andre hovedsakelig 20 kDa, 17 kDa og 5 kDa isoformene, slik at isoformratioen kan beregnes. Denne metoden ble validert og gjennomgått av WADA i 2004 og godkjent for bruk under OL i Athen [10]. Det er til nå analysert nesten 1000 prøver fra dopingkontroller, og i vinter kom de to første positive funnene, henholdsvis i England og Tyskland. Selv om man antar at det er mange flere som bruker rekombinant GH har det ikke vært flere funn. Den korte halveringstiden til GH i kroppen, som gir et deteksjonsvindu på 24-36 timer [11], er sannsynligvis hovedårsaken til dette. En annen viktig årsak er også at de fleste av disse prøvene er tatt etter en konkurranse, mens direktemetoden vil fungere best når den brukes i testing utenfor konkurranse som kommer overraskende på utøveren.

I løpet av årene fra GH-2000 gruppen ble satt sammen har det vært ett problem som har gjentatt seg flere ganger. Til analyse av markørene har de brukt ulike assay, og flere ganger underveis i prosessen har det assayet de har brukt enten blitt endret fra produsentens side eller blitt trukket tilbake fra markedet. Dette har ført til at de må finne en omregningsfaktor for å konvertere analysesvarene fra et assay over til det nye. For selv om assayene måler den samme prøven gir de forskjellige numeriske svar. WADA har prøvd å få til samarbeid med produsenter til å lage et assay som kan bli standard, men dette arbeidet har ikke ført frem ennå.

Det er også gjort studier for å finne andre måter å analysere IGF-1 på enn med assay. De har da brukt væskeskromatografi med elektronspray ionisasjon og tandem massespektrometri. De klarte da entydig å bestemme alle ønskede analytter av IGF-1 [12]. Dette er en analysemetode som er interessant for videre utvikling.

### 1.1.2. Biologiske pass:

Det nyeste innen antidopingarbeidet er biologiske pass. Biologiske pass er en database med hematologiske og hormonelle profiler for hver enkelt utøver som samles inn over tid. Ved bruk av individuelle profiler oppnår man at hver enkelt utøver er sin egen kontroll [13]. Etter hvert som man får flere prøver fra hver enkelt utøver blir utøverens normalområde mindre. Den enkeltes normalområdet er mye mindre enn om man skulle hatt et område for en hel populasjon. Dette ble tydelig på 90-tallet når UCI innførte en grense for hematokrit i blodet på 50 %. Da kunne utøvere med et naturlig lavt nivå dope seg opp til grensen på 50 % uten å stå i fare for å bli avslørt, mens utøvere med en naturlig høy verdi kunne få startnekt selv ved naturlige svingninger. Dette gjaldt også hemoglobinnivågrensen som ble innført av Det internasjonale skiforbundet (FIS) [13].

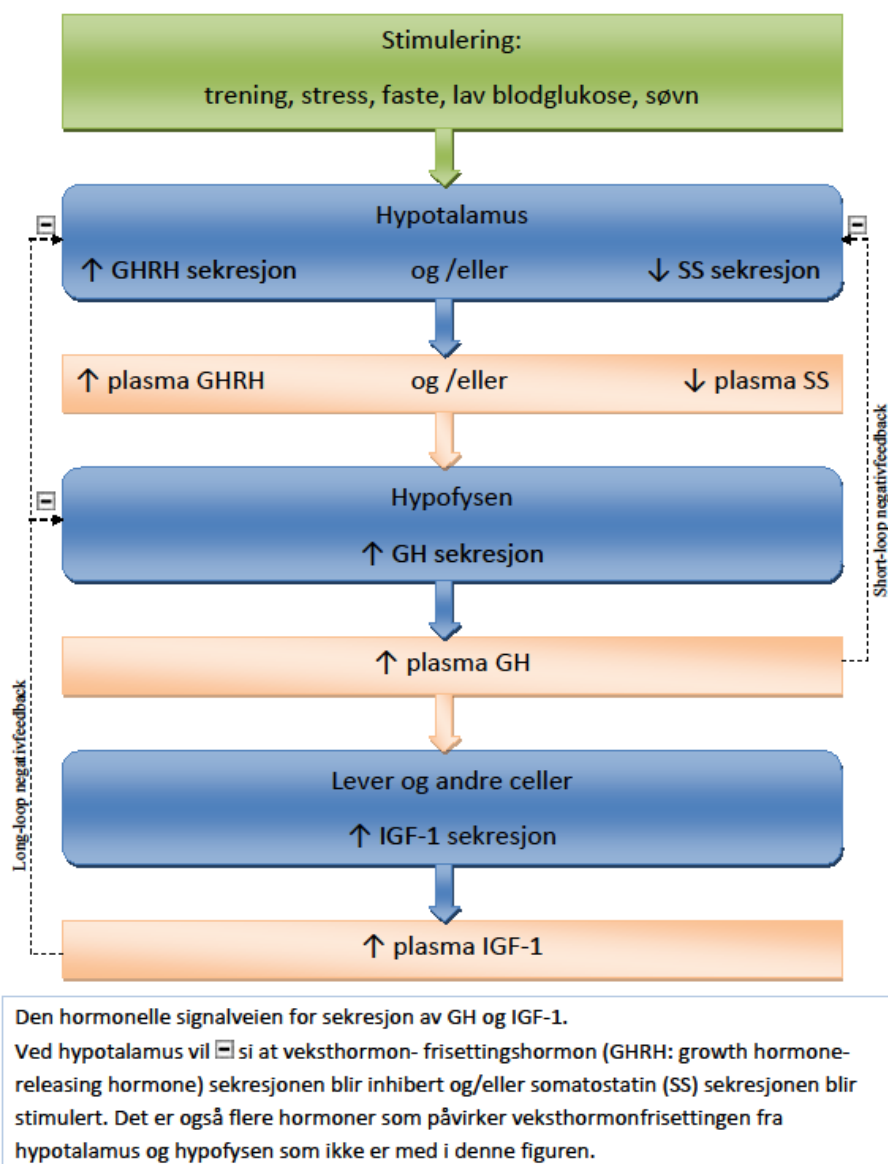
Bruken av biologiske pass har vært i en oppstartsfase i flere år nå, og 1. desember 2009 vedtok WADA retningslinjer for biologiske pass. Disse retningslinjene skal hjelpe antidoping byråene rundt om i verden med å innføre biologiske pass. Bruken av passene markerer et paradigmeskifte i antidopingarbeidet, for nå kan man oppdage bruk av nye dopingmidler ved å se på endringer i den enkeltes profil, uten å påvise stoffet [14]. De biologiske passene kommer ikke til å erstatte de vanlige dopinganalysene av urin- og blodprøver, men blir en av flere strategier for å avsløre dopingmisbruk.

## 1.2 Veksthormon (GH):

### 1.2.1. Sekresjon av GH:

Humant veksthormon (hGH) er et naturlig forekommende peptid som produseres i hypofysen. Det er et enkeltkjedet polypeptid med 191 aminosyrer, hvor to disulfidbroer stabiliserer strukturen. GH finnes i mange forskjellige isoformer, der 70 % har en vekt på 22 kDa, 5-10 %

på 20 kDa, mens de resterende prosentene består av andre former[10]. Veksthormon skilles ut fra hypofysen og reguleres av mange forskjellige faktorer. Stress, søvn, trening, faste og lavt glukosenivå i blodet, er noen av faktorene som fører til at hypothalamus gir signal om sekresjon av GH fra hypofysen. Sekresjonen i hypofysen skjer på en pulserende måte, og frisettingen reguleres av veksthormon- frisettingshormon (growth hormone releasing hormone, GHRH) og av somatostatin (SS). Ved økt konsentrasjon av GHRH vil frisetting av GH øke, mens økt konsentrasjon av SS inhiberer frisetting av GH. Det er blant annet konsentrasjonen av GH og IGF-1 i blodet som regulerer GHRH og SS konsentrasjonen i hypofysen ved en negativfeedback effekt (se figur 2) [11, 15].



Figur 2: [16]

### 1.2.2. Farmakologi:

GH har en halveringstid ( $t_{1/2}$ ) i blodet på mellom 13 og 20 minutter etter sekresjon. Ved trening nås maksimal konsentrasjon i blodet ( $t_{max}$ ) etter 15- 30 minutter [11], mens ved subkutan injeksjon kan  $t_{max}$  variere fra 2 til 6 timer [17]. GH konsentrasjonen er tilbake på grunnivået etter 8-16 timer ved intramuskulær injeksjon og etter 11- 20 timer ved subkutan injeksjon[11]. De store forskjellene i farmakologien og farmakokinetikken avhenger mye av alder og kjønn. I puberteten er sekresjonen på sitt høyeste og etter midten av 20-årene begynner sekresjonen å avta med ca 14 % per tiår. Nedgangen i GH sekresjon ettersom man blir eldre kan være årsaken til flere av de kroppslige endringene man får ved økt alder. For kjønnene er det også forskjeller, kvinner har generelt et høyere nivå av GH enn menn, mens svingningene er større hos menn enn hos kvinner. [17]

### 1.2.3. Effekter av GH:

På alle celler i hele kroppen er det GH-reseptorer som GH kan binde seg til. Når GH binder seg, settes det i gang mange forskjellige signalkaskader i cellen. Mange av disse signalkaskadene er undersøkt, men sammenhengen mellom dem er ikke fullstendig forstått ennå. Kaskadene kan føre til flere forskjellige biologiske responser som celledeling, regulering av metabolske signalveier, å hindre apoptose, reorganisering av cytoskjelettet, og differensiering og migrasjon av cellen[17]. Disse biologiske responsene kan føre til økt proteinsyntese som vil gi vekst i organene og vevene som stimuleres[15]. Disse effektene skjer etter direkte påvirkning fra GH, men GH fører også til indirekte responser via frisetting av bl.a. IGF-1, hovedsaklig fra leveren, men også fra celler perifert. IGF-1 fra leveren virker endogent og sirkulerer i blodet, mens det som frisettes fra celler perifert virker mest autokrint eller parakrint [18]. I forsøk der dyr har fått IGF-1 genet slettet i leveren, har dyrene normal vekst, men utvikler insulinresistens [19].

Det meste man vet om GH- effekter i kroppen, kommer fra studier av voksne med veksthormondefekt (adult growth hormone deficiency, AGHD). GH spiller en avgjørende rolle for kroppens oppbygning, fysikk, velvære og hjerte- og karsystemet. Fravær av GH vil få mange følger for kroppen. Noen eksempler er økt fett- mengde, mage til hofte ratioen øker, muskelmassen vil bli mindre, man får nedsatt psykisk og mental energi, søvnbehovet øker og man ser også en økt forekomst av hjerte- og karsykdommer[20]. Alle disse effektene blir mer

eller mindre raskt reversert ved å tilføre GH i form av rekombinant veksthormon (rhGH). Men disse effektene gjelder primært for voksne med veksthormon defekt, og kan ikke direkte overføres til friske voksne som tilfører ekstra GH. For ved oversekresjon av GH kan man utvikle akromegali. Akromegali gir unormal protein- og karbohydratmetabolisme, og man får som oftest nedsatt muskelstyrke. Ved langtids sykdom kan man også utvikle mer alvorlige symptomer [18]. Dette har blitt brukt som grunn til å påstå at GH ikke kan brukes som dopingmiddel. Men akromegali er ofte vanskelig å oppdage og mange går med sykdommen lenge før de får en diagnose. Derfor tror man at effekten av for mye GH over tid følger en ”Starling kurve”, hvor man har økt positiv effekt opp til et visst punkt, før effekten vil bli dårligere. Denne teorien kan også underbygges av historien til en roer som utviklet akromegali mens han var aktiv utøver. Han startet som en av de minste på laget og uten store forhåpninger om å lykkes i denne veldig fysiske sporten. I løpet av 4 år, fra han var 18, vokste han 15 cm, utviklet seg til å bli blant de sterkeste på laget, han var mest utholdende, og hadde en veldig rask restitusjon etter aktivitet. Noen år senere fikk han over natten veldig hovne hender og fikk påvist akromegali, med operasjon den påfølgende dagen [21]. Denne historien viser at det er mulig å få mange positive effekter av ”naturlig” økt GH, før man blir syk av det, og tyder på at GH kan brukes som dopingmiddel hvis det doseres og brukes riktig.

### 1.3 Insulin-like growth factor 1 (IGF-1):

#### 1.3.1. Farmakologi og sekresjon av IGF-1:

IGF-1 er et proteinhormon som består av 70 aminosyrer i en enkeltkjede med tre intramolekylære disulfidbroer [22]. Kun 5 % av IGF-1 i blodet er fritt, resten er bundet til bindeproteinene ”IGF binding proteins” (IGFBP’s). Det finnes flere forskjellige IGFBP, og av disse er IGFBP-3 den viktigste, siden 75- 80 % av IGF-1 er bundet til denne. Halveringstiden ( $t_{1/2}$ ) til IGF-1 som er fritt i blodet er veldig kort, kun noen få minutter, mens når IGF-1 er bundet til IGFBP, blir  $t_{1/2}$  betydelig lengre. For et binært kompleks av IGF-1 og IGFBP-3 er  $t_{1/2}$  20- 30 min, mens når det er i et kompleks med et tredje protein (syrelabil subenhet, ALS) har den en  $t_{1/2}$  på 12- 15 timer [17, 23]. Ved en subkutan injeksjon har IGF-1  $t_{max}$  på ca 7 timer og en  $t_{1/2}$  på 20 timer. For å få IGF til å vare lengre kan man injisere IGF-1 i et kompleks med IGFBP-3,  $t_{max}$  blir da 15- 19 timer og man har en effekt av injeksjonen i 24



timer [17, 24]. I en annen studie der forsøkspersonene ble gitt rekombinant GH, fant man t  $\frac{1}{2}$  til å være 89,5 timer, tilsvarende 3,7 døgn [10].

IGF-1 skilles hovedsakelig ut fra leveren etter at økt konsentrasjon av GH i blodet har gitt signal om det. IGF-1 som utskilles fra leveren går inn i blodstrømmen og virker på mange celler i hele kroppen. IGF-1 kan også utskilles fra andre celler mer perifert, men det som utskilles her virker mer parakrint og autokrint [18]. Når IGF-1 virker på cellen har det en oppbyggende effekt, og virker på karbohydrat-, fett- og proteinmetabolismen. IGF-1 gir også negativ feedback til produksjon av GH, som vist i figur 2.

### 1.3.2. Effekter av IGF-1:

Som for GH påvirker IGF-1 nesten alle celler i hele kroppen, der de viktigste effektene er stimulering av celledeling og cellevekst. Dette skjer ved at IGF-1 gir en vesentlig økt proteinsyntese [25] og påvirker glukosemetabolismen [26]. Det er også sett at IGF-1 har en hemmende effekt på insulin [27]. Personer med lite eller ingen IGF-1 i kroppen får ikke en normal vekstutvikling og blir ofte kortvokste. Grunnen til at de ikke produserer IGF-1, er defekte GH-reseptorer i leveren som ikke signaliser for produksjon av IGF-1 [28]. For å studere hvordan IGF-1 påvirker kroppen har man sett på behandling av kortvokste. Ved behandling får de rekombinant IGF-1 som substitusjon for den manglende egenproduksjonen. IGF-1 har da gitt en mer riktig vekst, og vesentlig økt proteinsyntesen som har ført til økt andel mager kroppsmasse og redusert mengden fettvev [25]. Disse effektene er også interessante å utnytte for idrettsutøvere, spesielt innen eksplosive idretter som vektløfting og sprint.

Friske mennesker som får administrert IGF-1 vil bli hypoglykemiske på grunn av den stimulerende effekten IGF-1 har på glukosemetabolismen [26]. Dette fordi celler perifert tar opp mer glukose og glykogenproduksjonen øker, det er også en liten nedgang i produksjon av glukose i leveren [17]. Disse effektene av IGF-1 kan utnyttes innen andre idretter enn de eksplosive, for med økt glykogenproduksjon får man større energilagre til utholdenhetsidretter. Dette vil være en fordel innen sykling og under lange løp, for eksempel på ski eller i maraton. Effekten av IGF-1 vil også hjelpe til å restituere seg forttere etter harde økter og konkurranser [27].

Bivirkninger som kan oppstå av IGF-1 bruk, er så langt ikke godt kjent på grunn av et foreløpig lite ubredt medisinsk. De fleste bivirkningene man vet om er korttidseffekter som irritasjon på injeksjonsstedet, ødem, hodepine, smerter i ledd og hypoglykemi. Disse effektene var sterkere og mer utpreget når man fikk IGF-1 injisert alene og ikke i kompleks med IGFBP-3 [29]. Det er også naturlig å regne med at langtidseffekter vil være lik de man ser ved langtidsbruk av GH. Blant annet er det sett vekst av skjelettet i ansiktet og av mandlene [27].

## 1.4 Procollagen type III N-terminal peptide (PIIINP):

### 1.4.1. Farmakologi og sekresjon av PIIINP:

Prokollagen er forstadiet til flere forskjellige typer kollagen i kroppen. Når prokollagen type III dannes, spaltes det fra modernmolekylet før det frisettes til blodsirkulasjonen i form av PIIINP [30]. Den videre spaltingen til kollagen type III skjer ved hjelp av spesifikke proteinaser [31]. For å bestemme halveringstiden til PIIINP i blod er det gjort studier der det er gitt GH, og man har så sett på økningen av PIIINP og funnet ut når den ble halvvvert igjen. For PIIINP er den funnet å være 693 timer, som tilsvarer over 28 døgn [10]. I den samme studien så de også på hvor fort økningen i PIIINP kom. Forsøkspersonene fikk daglig injisert rekombinant GH i 28 dager, enten i lav dose (0,1 IU/kg\* dag), høy dose (0,2 IU/kg\* dag) eller placebo. Det tok 28 dager før PIIINP konsentrasjonen var på sitt høyeste i høydose gruppen, og hadde da en 4 ganger økning i forfold til utgangskonsentrasjonen [32].

### 1.4.2. Effekter av PIIINP:

Det er type III kollagen som finnes i bløtvev og er en viktig del av bindevevet i muskler og hud. Konsentrasjonen i blodet av forstadiet til type III kollagen, PIIINP, gir derfor et tegn på om det er vekst og celledeling i bløtvev [30]. Ved leging av sår eller utvikling av skade i vev vil PIIINP konsentrasjonen øke, det er også sett økning i konsentrasjon ved vanlig vekst og ved sykdommer som skrumplever, myelofibrose og beinbrud [33, 34].

## 1.5 Bruk av stoffene i doping:

### 1.5.1. GH:

Bruk av GH som dopingmiddel er kjent først på slutten av 1970-tallet, og ble første gang omtalt i ”The Underground Steroid Handbook”, som ble utgitt av Dan Duchaine i 1982/3 [17, 35]. I denne boken omtales GH som ”det dyreste, mest fasjonable og minst forståtte av de nye atletiske dopingmidlene” (fritt oversatt fra [35]). I denne boken skriver han om hvordan GH fungerer og hvor man skal få tak i det. Beskrivelsene hans om GH sine funksjoner i kroppen er veldig gode og kommer nesten ti år før andre endokrinologer publiserer sine studier om GH. Det er også en del feil i boken når det gjelder anbefalinger om bruk av GH ekstrahert fra dyr til bruk i mennesker. Dette er senere vist å kunne føre til sykdommer, blant annet Creutzfeldt–Jakobs sykdom [17]. I boken skriver også Duchaine at GH bruk er godt etablert innen styrkeløft og vil innen få år bli brukt innen alle andre styrkeidretter.

Om dette faktisk har skjedd er ikke lett å fastslå med sikkerhet. For å finne ut prevalensen til doping bruken, må man gjette seg frem til det ut i fra antall saker som er kommet frem i løpet av de siste tretti årene. Selv om det fram til OL i Athen i 2004 var ansett som umulig å påvise veksthormondoping [11], har det vært en del saker der utøveren har blitt tatt for bruk av andre stoff, og i tillegg har innrømmet bruk av GH. Det mest kjente tilfelle i den forbindelse er da Ben Johnson ble tatt etter 100 meter gullet under OL i Seoul i 1988. Han ble tatt for bruk av stanazolol, men innrømmet også bruk av GH under en høring om saken [17]. Det har også vært saker der utøvere er blitt utestengt på bakgrunn av funn av GH ved innreise til land de skal konkurrere i (Yuan Yuan ved innreise til Perth i 1999 [17]) eller etter rassa av laboratoriet der de har fremstilt GH (BALCO- skandalen i 2003 [36]). I BALCO- saken ble det funnet lister over mange profilerte utøvere og trenere, blant annet innen baseball, amerikanske fotball og sprint, som skal ha mottatt GH og andre dopingmidler. Også blant studenter i USA er det sett et relativt høyt forbruk av GH. I en undersøkelse fra 1992 gjort ved to videregående skoler (high schools) i Chicago ble det funnet at 5 % av de mannlige studentene brukte eller hadde brukt GH, og 24,5 % kjente noen som hadde brukt det [37]. Dette viser at det har vært og er et økende forbruk av GH både blant toppidretts utøvere og blant folk som bruker det for å bygge muskler og ønsker å bli større og sterkere [11, 37].

Tilgangen på rekombinant GH har med årene blitt lettere å få tak i ved hjelp av internett. Hvis man søker etter kjøp av GH eller andre lignende dopingmidler på nettet vil man få opp mange

hundre tusen treff [35]. Kvaliteten på disse preparatene kan man ikke være sikker på, og vil helt sikkert variere. Mange av disse produktene er produsert utenfor kvalitetskontrollerte laboratorier og selges på svartebørsen. Derfor kan det være veldig risikabelt å kjøpe produkter over internett, i Norge er dette også ulovlig [38].

I undersøkelsen med studenter fra 1992 så de også på hvor brukerne hadde fått informasjonen sin fra, der svarte de fleste av brukerne at de hadde fått opplysninger fra andre personer, som for eksempel treneren [37]. Dette har også endret seg mye siden 1992, internett var ikke vanlig den gangen, men er nå en helt vesentlig informasjonskilde. Det finnes mange sider og prateforum der de både reklamerer for salg og kommer med mer eller mindre tvilsom informasjon om dopingbruk [39]. Men det finnes også flere sider som drives av organisasjoner [40, 41] som gir mye informasjon om dopingbruk, og sider som drives av tidligere brukere [42] som har opplevd dopings negative sider og vil informere og advare andre mot dopingbruk.

Effekten av GH- doping er mye omdiskutert. I de fleste kliniske forsøk er det sett liten effekt av GH på friske eller trente mennesker [43], det er derimot sett gode effekter hos voksne med veksthormondefekt (AGHD) [44, 45]. Det er også sett positive effekter i en ny studie med tidligere brukere av anabole steroider som fikk GH. Her ble det sett en økning i mager kroppsmasse, styrke og kraft [46]. Det er første gang man klarer å vise en positiv effekt ved bruk av GH i unge friske utøvere med en klinisk studie. Det kommer sannsynligvis av at kliniske studier er designet til å finne store endringer (20- 30 %), og med få variabler mellom gruppene som er med. Når det gjelder effekten av dopingmidler, så bruker doperne ofte blandinger av flere forskjellige stoff, og effekten trenger ikke være opp mot 20 %. For en toppidrettsutøver kan 1 % i forskjell på tid eller styrke være nok til å skille mellom en 10. plass eller 1. plass i en konkurranse. Det er denne ene prosenten utøverne trener for hver dag hele året, men som også kan oppnås ved bruk av ulovlige midler. [17]

### 1.5.2. IGF-1:

Bruken av IGF-1 innen doping er antatt å være en god del mindre enn for GH. En sannsynlig hovedårsak til dette er tilgjengeligheten til stoffet. IGF-1 har ikke hatt noen naturlig kilde, og må fremstilles med rekombinant DNA-teknikk [47]. På det lovlige markedet finnes det for tiden kun to IGF-1 preparater [17], men på enkelte nettsider kan man finne informasjon om IGF-1 kit som er produsert i Kina og Australia. Disse kitene er ikke godkjente produkter og

kvaliteten er usikker [42]. Man antar at bruken av IGF-1 skjer både alene og sammen med andre dopingmidler, som anabole steroider eller GH [27]. På grunn av bedre analysemetoder for GH doping og økt tilgjengelighet av IGF-1 i de kommende årene, regner man med at mengden brukere av IGF-1 vil øke [48].

## 1.6. Hensikt med oppgaven:

GH- doping ble forbudt så tidlig som i 1989 av IOC, og står på WADAs liste over forbudte stoffer [5]. Selv om dette er lenge siden har det vært vanskelige å påvise misbruket og utviklingen av en metode har tatt lang tid. Metoden utviklet av Strasburger og Bidlingmaier [49] har skaffet en metode som fungerer, men med et for lite deteksjonsvindu til at den er god nok. Metoden utviklet av GH-2000 gruppen med deteksjon ved hjelp av indirekte markører, skal klare å påvise dopingbruken i inntil to uker etter siste GH- injeksjon, og den har gode resultater i alle studiene som er gjort [17]. Implementering av metoden har vært vanskelig på grunn av store forskjeller i kitene som skal brukes til å analysere prøvene. Det er også sett store forskjeller i markørverdiene mellom personer, grunnet blant annet kjønn, alder og generelle individuelle forskjeller. For å omgå disse forskjellene kan vi ta i bruk personlige profiler for markørene, der man fungerer som sin egen kontroll.

Hensikt med denne oppgaven var å måle konsentrasjonen av markørene IGF-1 og PIIINP i serum over tid. Vi har så sett på nytten av individuelle profiler for markørene og om vi kan definere individuelle grenseverdier til å indikere GH- misbruk. Vi har også analysert prøvene med den eksisterende WADA- akkrediterte metoden for direkte påvisning av GH- doping.

## 2. Eksperimentelt

### 2.1. Forsøkspersoner:

I studien var det totalt med 31 frivillige personer (26 menn og 5 kvinner). Alle de frivillige har blitt informert om studiens formål og lengde, og signert samtykkeskjema. Studien er godkjent av Regional etisk komité (REK).

Forsøkspersonene ble delt inn i fire grupper; styrkeutøvere, utholdenhetsutøvere, normalbefolkning og brukere. Styrkeutøverne inneholder utøvere innen vektløfting og styrkeløft, utholdenhetsutøverne driver med langrenn, utøverne i disse gruppene konkurrerer på ett høyt nasjonalt nivå, noen konkurrerer også internasjonalt. Normalbefolkning er kontrollgruppe. Brukergruppen består av frivillige som har et privat forbruk av forskjellige dopingmidler, inkludert veksthormon. Ved prøveavleggelse har de frivillig opplyst om hvilke preparater de har brukt i den foregående perioden. De styrer selv hva de bruker og har også avlagt prøver i perioder de ikke har brukt noen preparater.

	Antall deltakere	Alder
Styrke	9♂	25±6
Utholdenhet	6♂	27±4
Brukere	6♂	33±7
Normalbefolkning	5♂/5♀	29±7
Alle deltakere	26♂/5♀	28±7

Tabell 1: Kjønn og aldersfordeling av forsøkspersonene

### 2.2. Gjennomføring av forsøket:

Forsøkspersonene avla blod- og urinprøver cirka hver 3. måned. Urinprøvene ble frosset ned straks etter innsamling for eventuell senere steroidprofilanalyse. Før blodprøvene ble tatt, måtte forsøkspersonene sitte ned i 10 minutter. Blodprøvene ble satt til koagulering, før de ble sentrifugert, serum avpipettert og frosset ned (-20 °C) fram til analyse. Det er på nåværende tidspunkt blitt avlagt totalt 73 prøver.

Deltakerne i styrke- og utholdenhetsgruppen har avlagt prøvene ved Norges Idrettshøyskole (NIH). Prøvene ble hentet og fraktet til doping laboratoriet i frossen tilstand.

Deltakerne i brukergruppen og kontrollgruppen med normalbefolkning har avlagt prøvene på dopinglaboratoriet.

## 2.3. Utstyr brukt til analyse:

### 2.3.1. IGF-1:

Til å analysere IGF-1 i serum ble det brukt et Immulite 2500® IGF-1 kit (Siemens Healthcare Diagnostics, California, USA). Analysen ble gjort ved Hormonlaboratoriet, Oslo Universitetssykehus, Aker. Immulite 2500® IGF-1 kitet er et automatisert enzymmerket, ikke kompetitiv immuno~~l~~uminometrisk assay (ILMA). Analyse av IGF-1 er vanskelig på grunn av IGFBP og proteinheter som er bundet til IGF-1 i blodet. Disse komponentene må frigjøres fra IGF-1 før analyse, og dette gjøres ved syrebehandling av serumprøvene. [50]

I analysen er det to forskjellige antistoff, et polyklonalt antistoff fra kanin merket med alkalisk fosfatase, og et monoklonalt antistoff fra mus koblet til en polystyrenkule. Det monoklonale antistoffet binder seg til IGF-1, deretter binder det polyklonale antistoffet seg til IGF-1 på et annet sted på molekylet. Det blir da et sandwichkompleks der IGF-1 er bundet og det dannes et kjemisk luminescens-signal av reaksjonen mellom fosfatase og dioxetanfosfat i substratet [51].

### 2.3.2. PIIINP:

PIIINP ble målt ved bruk av UniQ PIIINP RIA kit, fra Orion Diagnostica, Espoo, Finland. Kitet er et kompetitiv radioimmunoassay (RIA). Analysen utføres ved å tilsette serumprøve,  $I^{125}$  merket sporstoff (tracer) og antiserum til prøverøret. I røret er det da en kjent mengde av  $I^{125}$  merket PIIINP og en ukjent mengde umerket PIIINP fra prøven. Disse konkurrerer om plassen på et begrenset antall bindingssteder på antiserumet. Etter binding til antiserum blir resten vasket ut, og mengden  $I^{125}$  merket PIIINP som er bundet i prøverøret blir omvendt proporsjonal med konsentrasjonen av PIIINP i prøven. Konsentrasjonen i prøven finnes ved å avlese prøven med en gammateller, som måler radioaktiviteten fra sporstoffet, og bruke en kalibreringskurve. [52]

### 2.3.3. GH:

Prøvene ble også analysert for veksthormon, med hGH LIA Kit 1 og 2 fra CMZ-assay, som er det akkrediterte kitet for bruk ved dopinglaboratoriene i verden til å detektere GH doping.

hGH kitet er et immunoluminometrisk assay (ILMA) og fungerer ved å detektere de forskjellige isoformene til GH. Når rekombinant GH (rhGH) tilføres kroppen, er det kun 22 kDa isoformen som gis. Dette vil føre til at ratioen mellom 22 kDa og ikke-22 kDa isoformene vil endres, og i tillegg vil den negativ feedback mekanismen senke den endogene produksjonen av GH. Det er ved å se på denne endrede ratioen man kan bestemme om prøven er positiv eller negativ. [53]

hGH LIA kitet består av et Kit 1 og 2, der Kit 2 brukes til bekreftelse når man har fått et positivt funn i Kit 1. Disse kitene er identiske når det gjelder prosedyren for analysen. Den viktige forskjellen er at det er en annen variant av antistoffet i Kit 2 (bekreftelse) enn det er i Kit 1 (screening), dette er viktig fordi WADA krever at det for immunoassays skal brukes forskjellige antistoff til screening og bekreftelse. Dette står beskrevet i "International Standard for Laboratories", ISL 6.2.4.2.1.2. [54].

Kitet analyseres med to parallelle kjøring, der den ene, "Pit", ser etter alle de endogent produsert GH- isoformene fra hypofysen (pituitary), mens den andre, "Rec", ser etter kun 22 kDa varianten. Til analysen følger det med ferdig antistoffdekkede (coated) rør som er spesifikke for enten 22 kDa GH eller alle de endogent produsert isoformene, med mindre preferanse for 22 kDa. Det andre antistoffet som brukes er felles for de to parallelle kjøringene og fungerer som sporstoff (tracer) og er luminescens-merket.

Analysen utføres ved å tilsette serumprøve og buffer til reagensrøret, før den settes til den første av to inkubasjoner. I den første inkubasjonen blir hGH i prøven bundet til antistoffene i røret. Etter inkubasjon i 2 timer, vaskes røret for det som ikke har bundet seg til antistoffene. I den neste inkubasjonen tiden på 2 timer, tilsettes det luminescens-merkede sporstoffet, sporstoffet binder seg til den allerede bunnede hGH i røret og danner et sandwichkompleks. Det overflødige sporstoffet vaskes ut etter inkubasjonen og prøven er klar til å analyseres i luminometeret. I begge inkubasjonstrinnene er det overskudd av antistoff, så alt skal kunne binde seg til prøven. Mengden sporstoff som er bundet i røret er direkte proporsjonal med mengden hGH i prøven. Konsentrasjonen finner man ved å sammenligne svaret fra prøven med en standardkurve, som lages sammen med hver kjøring av analysen. Ut fra svaret av kjøringene med rec og pit regner man ut en ratio som sier om prøven er over eller under cut-off. [53]



## 2.4. Validering:

### Selektivitet og spesifisitet:

Når man ser på selektivitet og spesifisitet ser man om metoden interferer med andre stoffer i prøven, som vil påvirke svaret. Dette er viktig her siden det er antiserum som ikke må kunne binde til andre stoff i blodet. [55]

For de brukte kitene er dette oppgitt fra produsentene.

### Nøyaktighet og presisjon:

Nøyaktighet angir hvor nærme man kommer den ”sanne” verdien som prøven har. Dette angis i prosentvis avvik.

Presisjon sier hvordan spredningen i resultatene ved gjentatte forsøk er, der man regner med å få det samme svaret hver gang. Dette angis i relativt standardavvik (CV %). [55]

Kravet for godkjenning av nøyaktighet og presisjon er på 20 %, men i praksis på laboratoriet ser man helst at det ikke overstiger 10 %.

Alle kitene er validert av produsentene, og resultatene er oppgitt i bruksanvisningene som ligger vedlagt kitet. Metodene som benyttes for IGF-1 og GH er også validert ved henholdsvis Hormonlaboratoriet og Norges laboratorium for dopinganalyse. På PIINP kitet ble det utført beregning av intra- og inter-assay for presisjon.

### Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense:

Deteksjonsgrensen (limit of detection, LOD) er den laveste konsentrasjonen som med god nok sikkerhet er detekterbar av kitet. LOD er vanligvis tre ganger standardavviket, som blir kalkulert fra flere paralleller i en validering. Kvantifiseringsgrensen (limit of quantitation, LOQ) er den laveste konsentrasjonen som med god nok sikkerhet kan kvantifiseres av kitet. LOQ settes ofte til ti ganger standardavviket som blir kalkulert fra flere paralleller i en validering. [55]

For IGF-1 kitet er det oppgitt et måleområde, dette måleområdet er også validert og justert ved Hormonlaboratoriet. For GH kitet er kitets sensitivitet oppgitt i håndboken, og ved valideringen ved Norges laboratorium for dopinganalyse ble LOD og LOQ beregnet. For PIINP kitet er det oppgitt LOD og et måleområde.

### 3. Resultater:

#### 3.1. Validering:

##### 3.1.1. IGF-1:

###### Selektivitet og spesifisitet:

For IGF-1 har produsenten sett på interferens fra andre stoff, og tilsatt de i prøver for å se om det har blitt noen kryssreaksjoner. De har testet for proinsulin, insulin, luteiniserende hormon (LH), tyreodeastimulerende hormon (TSH) og insulin-like growth factor II (IGF-II). Det ble ikke detektert noen kryssreaksjoner for noen av stoffene, ved tilsetning i lav, middels og høy mengde.

###### Nøyaktighet og presisjon:

Presisjonen er beregnet av produsenten og av Hormonlaboratoriet. Ved hormonlaboratoriet er det brukt tre prøver med forskjellige konsentrasjoner til beregningen, se tabell 2.

Intra-assay presisjon			Inter-assay presisjon		
Prøve	Gjennomsnitt nmol/l	CV (%)	Prøve	Gjennomsnitt nmol/l	CV (%)
Lav	4,6	5	Lav	11,1	7
Middels	32,0	7	Middels	23,8	6
Høy	90,0	6	Høy	35,2	7

Tabell 2: Intra- og inter-assay presisjon for IGF-1, fra Hormonlaboratoriet

Omregningsfaktoren mellom nmol/l og ng/ml er,  $1 \text{ nmol/l} = 7,65 \text{ ng/ml}$ ,  
 $1 \text{ ng/ml} = 0,13 \text{ nmol/l}$ .

###### Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense:

For IGF-1 kitet har produsenten oppgitt et måleområde fra 20 ng/ml opp til 1600 ng/ml. Ved valideringen gjort ved Hormonlaboratoriet ble det testet ut flere lave konsentrasjoner for å se hvor lavt måleområde de skulle sette. De kom frem til en nedre grense på 3,3 nmol/l, som tilsvarer 25,2 ng/ml. Som øvre grense fant de 208,0 nmol/l, som tilsvarer 1591,2 ng/ml.

### 3.1.2. PIINP:

#### Selektivitet og spesifisitet:

Produsenten har testet ut serum bilirubin, serum hemoglobin og triglyserider. Ingen av disse stoffene interfererte ved konsentrasjoner på henholdsvis  $< 400 \mu\text{mol/l}$ ,  $5 \text{ g/l}$ , eller  $< 30 \text{ g/l}$ .

Kitet er heller ikke sensitivt for mindre nedbrytningsprodukter som finnes i blodet.

#### Nøyaktighet og presisjon

Intra- og inter-assay for presisjon, ble beregnet på laboratoriet som vist i tabell 3.

Intra-assay presisjon 6 replikater			Inter-assay presisjon 4 duplikater		
Prøve	Gjennomsnitt $\mu\text{g/l}$	CV (%)	Prøve	Gjennomsnitt $\mu\text{g/l}$	CV (%)
AK1	4,1	4,6	AR1	8,6	3,1
ØR1	5,6	10,1	KET1	4,8	2,8
BAB1	5,4	4,0	JH1	4,9	11,0

Tabell 3: Intra- og inter-assay presisjon for PIINP.

#### Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense:

Måleområdet til kitet er  $1,0 - 50 \mu\text{g/l}$ , og LOD er tilnærmet  $0,3 \mu\text{g/l}$ , som er to ganger standardavviket til nullbindingskalibratoren.

### 3.1.3. GH:

#### Selektivitet og spesifisitet:

Produsenten har testet ut bilirubin, hemoglobin, triglyserider og humant serum albumin. Fem serumprøver ble tilsatt disse stoffene i konsentrasjoner på henholdsvis  $500 \text{ mg/dl}$ ,  $40 \text{ mg/dl}$ ,  $3000 \text{ mg/dl}$  og  $1 \text{ g/dl}$ . Det ble ikke funnet noen positive eller negative systematiske påvirkninger på analysen, og resultatet av prøvene ble ikke påvirket.

Nøyaktighet og presisjon:

Under valideringen av kitet ved Norges laboratorium for dopinganalyser ble presisjon og nøyaktighet beregnet, se tabell 4 og 5. Etter at valideringen ble gjort har produsenten byttet navn på kitene. Det som er omtalt som Kit A i valideringen heter nå Kit 2 og brukes til bekreftelses analyse, mens Kit B nå heter Kit 1 og brukes til screening.

Presisjon			
Intra-assay (repeterbarhet)		Inter-assay (reproduserbarhet)	
	CV (%)		CV (%)
Kit A Pit	6,4	Kit A Pit	3,7
Kit A Rec	8,0	Kit A Rec	3,7
Kit B Pit	4,9	Kit B Pit	5,4
Kit B Rec	3,5	Kit B Rec	4,6

Tabell 4: Presisjon for hGH LIA kit

Nøyaktighet			
Intra-assay (nøyaktighet)		Inter-assay (nøyaktighet)	
	Avvik (%)		Avvik (%)
Kit A Pit	3,4	Kit A Pit	5,1
Kit A Rec	14,0	Kit A Rec	4,7
Kit B Pit	3,9	Kit B Pit	2,7
Kit B Rec	11,3	Kit B Rec	8,5

Tabell 5: Nøyaktighet for hGH LIA kit

Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense:

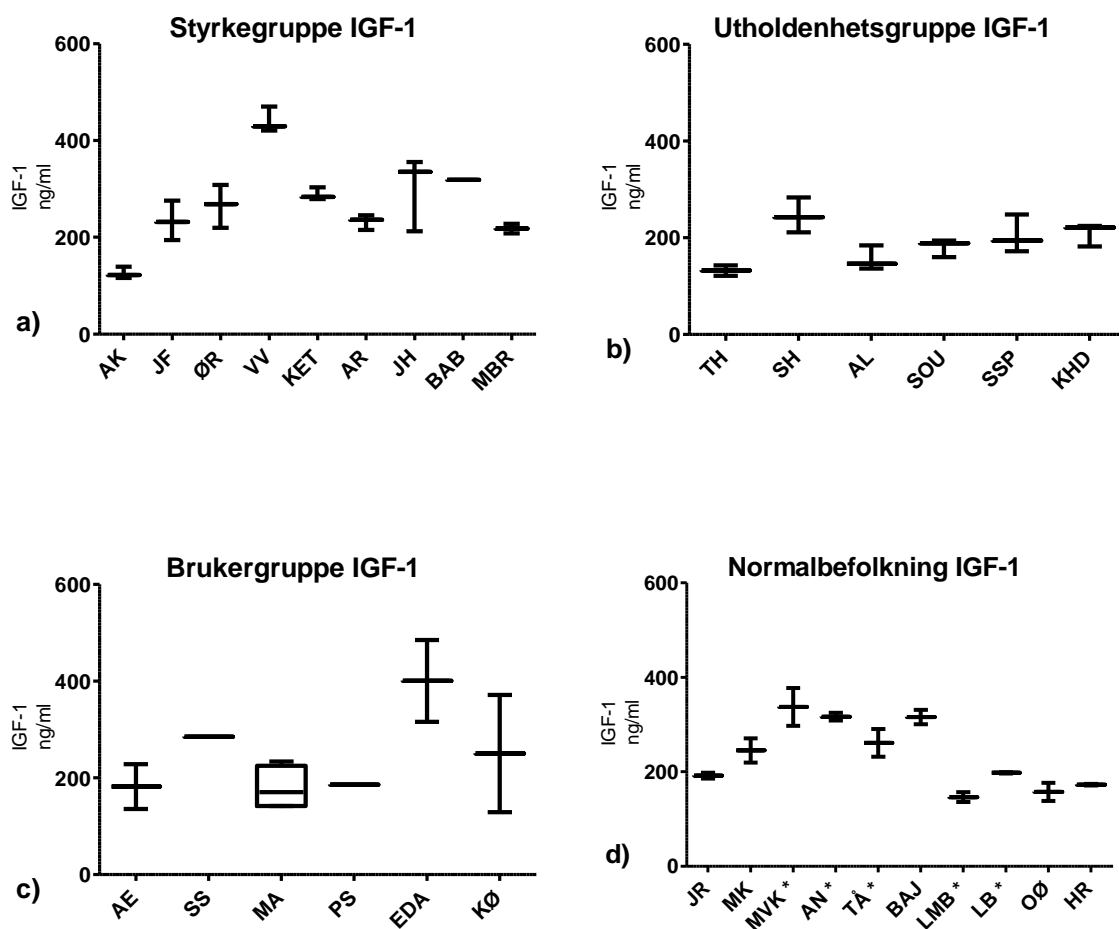
LOD for kitet ble beregnet av produsenten til å være 0,021 ng/ml for rec og 0,023 ng/ml for pit assayet. De brukte da 40 paralleller av 0-standarden og la til tre standardavvik. LOQ ble beregnet til å være 0,027 ng/ml for rec, og 0,040 ng/ml for pit assayet, denne verdien er grensen for et inter-assay relativt standardavvik (CV %) på 20 %.

LOD ble, ved Norges laboratorium for dopinganalyser, beregnet til å være 0,01 ng/ml for rec, og 0,012 ng/ml for pit assayet. LOQ ble beregnet til 0,025 ng/ml for rec og 0,04 ng/ml for pit assayet.

## 3.2. Analyseresultater:

### 3.2.1. IGF-1

Resultatene for hver enkelt forsøksperson er fremstilt med boks-plot i figur 3. I styrke- og utholdenhetsgruppen har de fleste forsøkspersonene avlagt tre prøver, i normalbefolkningsgruppen har alle avlagt to prøver, og i brukergruppen har én deltaker avlagt fire prøver (den fjerde er kun analysert for IGF-1), tre deltakere avlagt to prøver og to deltakere avlagt én prøve. Resultatene er inndelt med en gruppe i hver graf. I figur 4 viser gjennomsnittsverdiene for de ulike gruppene samlet.



Figur 3: Øvre og nedre strek er maksimal- og minimumsverdien, den midtre streken viser gjennomsnittet av målingene. I d) er kvinner merket med \*.

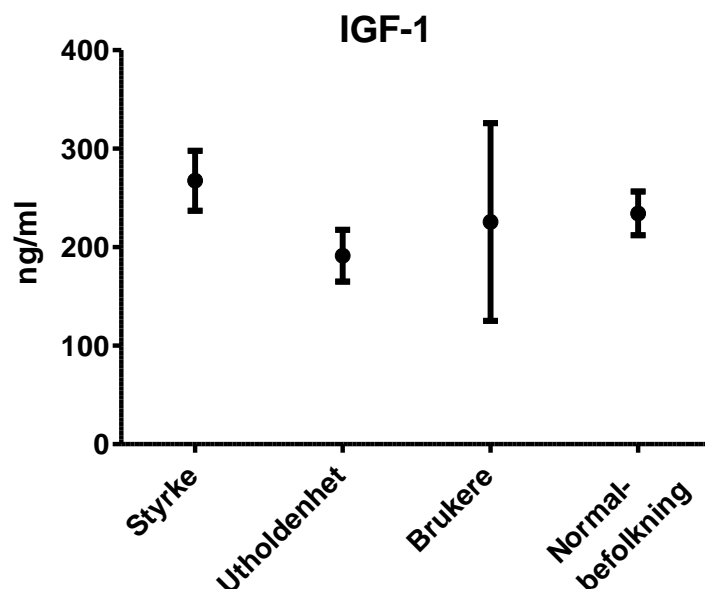
For styrkegruppen i figur 3 a) ser vi at det er store variasjoner mellom utøverne, og enkelte utøvere har tildels store individuelle variasjoner. VV ligger jevnt veldig høyt, like høyt som noen av brukerne ligger i sine prøver avgitt i perioder der de bruker dopingmidler. På

grunnlag av de tre prøvene, som alle ligger høyt og med liten variasjon, antar vi at han har et naturlig høyt nivå. Dette viser hvor store individuelle forskjeller det kan være. VV har hele 3,5 ganger høyere gjennomsnittsnivå av IGF-1 enn det AK har.

For utholdenhetsgruppen ser vi at hver enkelt utøver har små variasjoner (figur 3 b). De ligger også lavere og jevnere i konsentrasjon av IGF-1 enn det styrkegruppen gjør. Dette kan også ses i figur 4.

For brukergruppen ser vi store variasjoner mellom de forskjellige deltakerne (figur 3 c). For AE, EDA og KØ er de to prøvene de har avlagt, fra en periode med bruk av GH-dopingmidler og fra en periode uten (men kan ha brukt andre dopingmidler, som anabole steroider). Vi ser da veldig store utslag i de forskjellige periodene. For MA er det avlagt tre prøver i periode med GH-dopingmidler og en prøve fra periode uten. Han har liten variasjon mellom prøvene.

I figur 3 d) ser vi at den individuelle variasjonen for normalbefolkningen er liten for de fleste deltakerne. I gruppen er det med fem kvinner, men de skiller seg ikke ut i forhold til mennene.



Figur 4: Figuren viser gjennomsnittsverdien med ett standardavvik for de ulike gruppene.

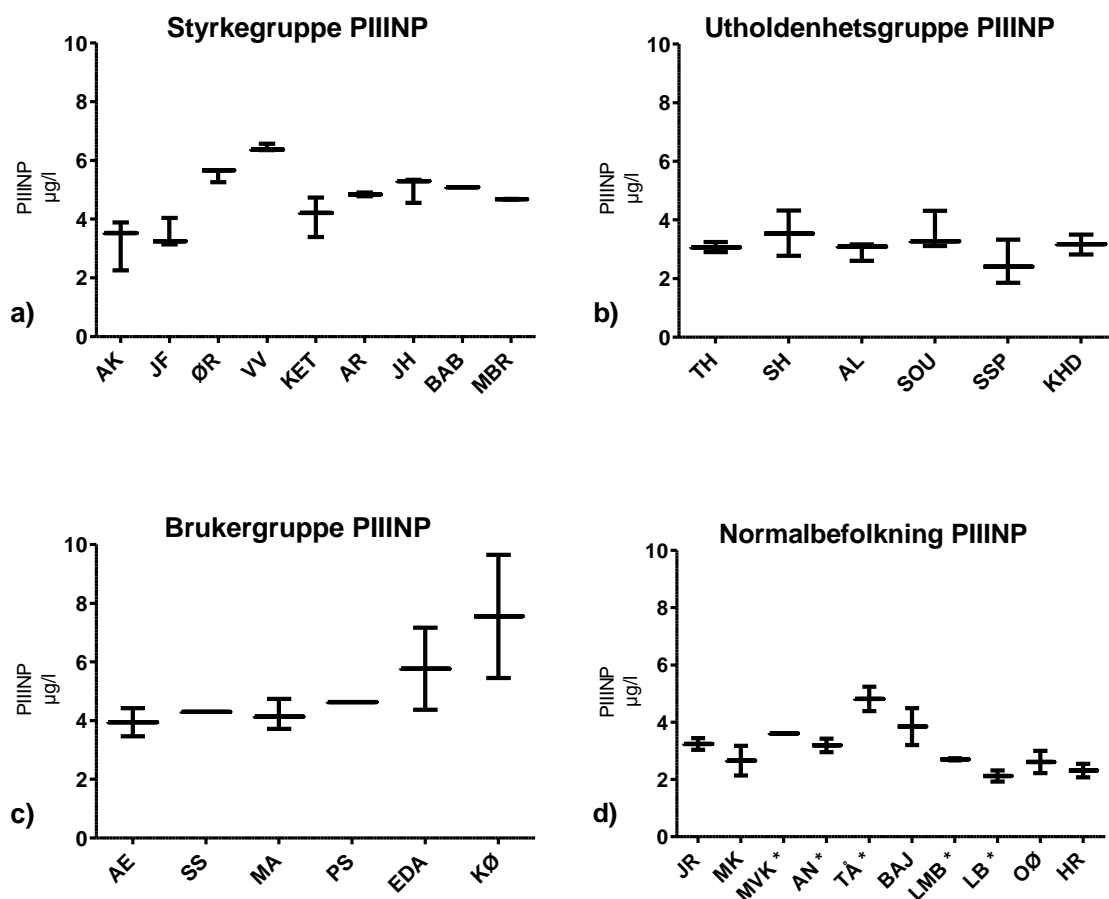
Vi ser at det er relativt små forskjeller i standardavvikene for styrke-, utholdenhets- og normalbefolkningsgruppene, de er på henholdsvis 30,4, 26,3 og 22,2 ng/ml. Brukergruppen har 3,8 ganger så høyt standardavvik som de andre gruppene i gjennomsnitt, med et standardavvik på 100,4 ng/ml. Gjennomsnittsverdiene i gruppene er relativt like, der

styrkegruppen er høyest med 267,5 ng/ml, mens utholdenhetsgruppen ligger nederst med 191,4 ng/ml.

Det ble også gjort One-way ANOVA analyse av resultatene. Med Bartlett's post test for lik varians, så vi på om det var signifikant forskjell mellom variansen i gruppene, det var det ikke for IGF-1. Vi så også på om det var forskjeller i gjennomsnittet (mean) mellom gruppene. For IGF-1 var det ikke signifikante forskjeller mellom noen av gruppene, det skyldes at variasjonen innad i hver gruppe overlapper hverandre.

### 3.2.2. PIINP:

Resultatene for hver enkelt forsøksperson er fremstilt med boks-plot i figur 5. Resultatene er inndelt med en gruppe i hver graf. I figur 6 viser gjennomsnittsverdiene for de ulike gruppene samlet.



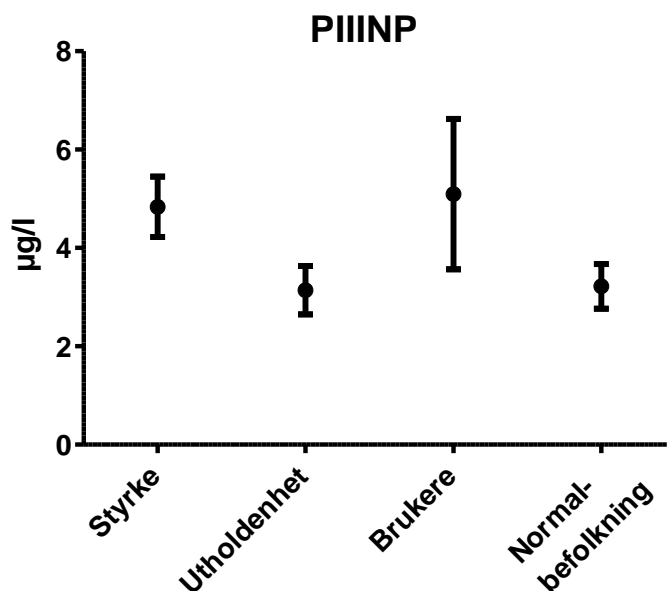
Figur 5: Øvre og nedre strek er maksimal- og minimumsverdien, den midtre streken viser gjennomsnittet av målingene. I d) er kvinner merket med \*.

For styrkegruppen i figur 5 a) er de individuelle forskjellene små, mens de interindividuelle forskjellene er ganske store mellom de forskjellige utøverne. For AR er det her tatt bort en måling fra en prøve som hadde stått 28 timer i romtemperatur før prøven ble sentrifugert og frosset ned. Prøven hadde en verdi på 8,4  $\mu\text{g/l}$ . Den lange oppbevaringstiden i romtemperatur før sentrifugering kan ha ført til økt konsentrasjon av PIINP i prøven [56].

I figur 5 b) ser vi for utholdenhetsgruppen at de individuelle forskjellene er litt større enn for de fleste i styrkegruppen, men fortsatt små. De interindividuelle forskjellene er her mye mindre enn i styrkegruppen.

For brukergruppen er forskjellene mellom deltakerne ikke så store, dette til tross for at prøvene fra de fire første i gruppen er både fra "ren" periode og fra periode med bruk av GH-dopingmidler (figur 5 c). De individuelle forskjellene er veldig store for EDA og KØ i de prøvene der den ene prøven var avgitt i doping fri periode og den andre i periode med bruk av GH-dopingmiddel. For brukerne SS og PS har vi bare fått en prøve så langt, derfor vet vi ikke noe om variasjonene deres. De blir derfor ikke diskutert videre i oppgaven.

For normalbefolkningsgruppen i 5 d), er de individuelle forskjellene små og ligger stabilt innenfor et lite område. De interindividuelle forskjellene er noe større i denne gruppen sammenlignet med utholdenhetsgruppen.



Figur 6: Figuren viser gjennomsnittsverdien med ett standardavvik for de ulike gruppene.

Vi ser her at standardavviket i brukergruppen på 1,53  $\mu\text{g/l}$ , igjen er mye større enn de andre gruppene, som har ett gjennomsnitt i standardavviket på 0,44  $\mu\text{g/l}$ . Konsentrasjonen av

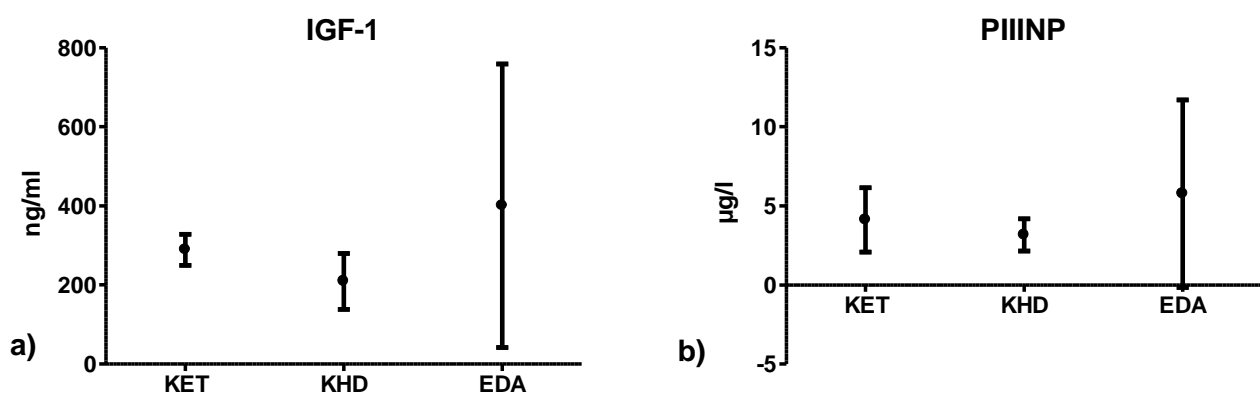


PIIINP er også høy for både brukergruppen, 5,1  $\mu\text{g/l}$  og styrkegruppen 4,8  $\mu\text{g/l}$ , i forhold til de andre gruppene som har gjennomsnitt på 3,1  $\mu\text{g/l}$  (utholdenhet) og 3,2  $\mu\text{g/l}$  (normalbefolkning).

Med One- way ANOVA analyse og Bartlett's post test for lik varians, fant vi at det ikke var signifikant forskjell mellom variansen i gruppene for PIIINP. Vi så også på om det var forskjeller i gjennomsnittet (mean) mellom gruppen. For PIIINP var det signifikante forskjeller mellom styrkegruppen og utholdenhetsgruppen ( $P < 0,05$ ), og styrkegruppen og normalbefolkning ( $P < 0,01$ ). Det var også signifikante forskjeller mellom brukergruppen og utholdenhetsgruppen ( $P < 0,05$ ), og brukergruppen og normalbefolkning ( $P < 0,01$ ).

### 3.2.3. Tre forsøkspersoner med representativt standardavvik:

Grafen i figur 7 viser gjennomsnittsverdiene til tre forskjellige forsøkspersoner. KET er i styrkegruppen, KHD er i utholdenhetsgruppen, mens EDA er i brukergruppen. Prøvene til EDA inneholder prøver avlagt både når han brukte GH- dopingmidler og når han var av GH- dopingmidler (men kan ha brukt andre dopingmidler som anabole steroider). Grafen viser gjennomsnitt  $\pm 3$  standardavvik. Dette sier noe om hvor store endringer det er for hver av de ovennevnte forsøkspersonene, mellom de forskjellige prøvene de har avlagt.



Figur 7: Grafen viser gjennomsnitt og  $\pm 3$  standardavvik.

For IGF-1, i figur 7 a), er KET blant de med lavest standardavvik i styrkegruppen. Hans standardavvik er på 13,0 ng/ml, mens gjennomsnittet i gruppen er 30,4 ng/ml.

Gjennomsnittskonsentrasjonen hans på 288,9 ng/ml er rett over gjennomsnittet for gruppen på

267,5 ng/ml. KHD sitt standardavvik på 23,5 ng/ml, ligger cirka på gjennomsnittet for utholdenhetsgruppen som er 26,3 ng/ml. Konsentrasjonen hans er litt over gjennomsnittet med 209,1 ng/ml, mot snittet på 191,4 ng/ml. EDA har som tidligere vist både en prøve med bruk av GH- dopingmidler og en prøve uten, det er derfor naturlig å se et så høyt standardavvik som vises her. Han har et standardavvik på 119,5 ng/ml, som er litt over gjennomsnittet for gruppen på 97,2 ng/ml. Gjennomsnittskonsentrasjonen hans ligger høyest i brukergruppen med 400,5 ng/ml, mot snittet på 224,8 ng/ml.

For PIINP, i figur 7 b), er KET blant de med høyest standardavvik i styrkegruppen, med 0,68 µg/l, gjennomsnittet for gruppen er på 0,37 µg/l. Gjennomsnittskonsentrasjonen hans ligger like ved snittet for gruppen, med 4,1 µg/l mot snittet på 4,8 µg/l. KHD ligger lavt i standardavvik i utholdenhetsgruppen, med 0,34 µg/l, snittet for gruppen er på 0,509 µg/l. Konsentrasjonen hans på 3,2 µg/l ligger også ved gjennomsnittskonsentrasjonen for gruppen (3,1 µg/l). EDA har igjen et veldig høyt standardavvik på 1,98 µg/l, snittet for brukergruppen er 1,53 µg/l. Gjennomsnittskonsentrasjonen hans på 5,8 µg/l, ligger litt over snittet for gruppen på 5,1 µg/l.

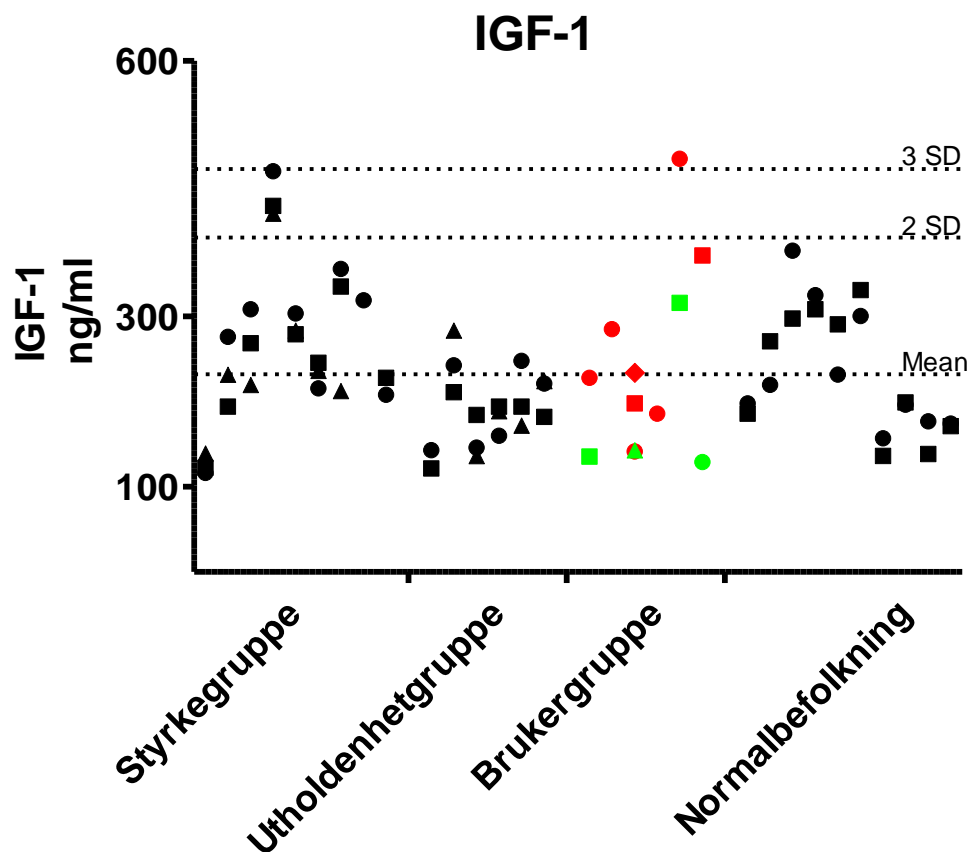
### 3.2.4. Individuelle målinger:

Resultatene for hver enkelt måling er fremstilt grafisk sammen med cut-off grenser for hver markør i figur 8-10. For GH er cut-off verdiene de som brukes ved dopingtester, mens for IGF-1 og PIIINP er det markert for to og tre standardavvik over gjennomsnittet av målingene.

Tegn- og fargekoder i grafene:

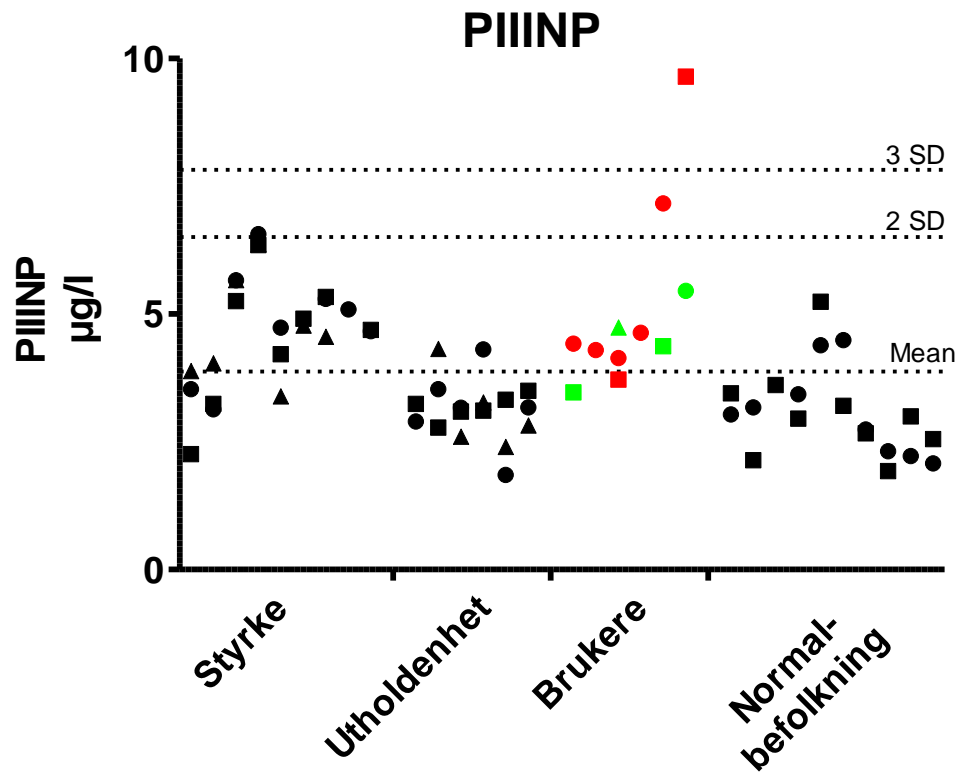
- = prøve 1
- = prøve 2
- ▲ = prøve 3
- ◆ = prøve 4
- = prøve fra bruker
- = prøve fra bruker i periode uten bruk av GH- dopingmiddel
- = kvinner (gjelder figur 11)

For figur 8 og 9, er gjennomsnittet (mean) og standardavviket (SD) beregnet fra alle prøver som i utgangspunktet er negative, det vil si at prøver fra brukere er tatt med fra de periodene de ikke brukte hGH (men de kan ha brukt andre dopingmidler som anabole steroider), men utelatt når de brukte hGH.



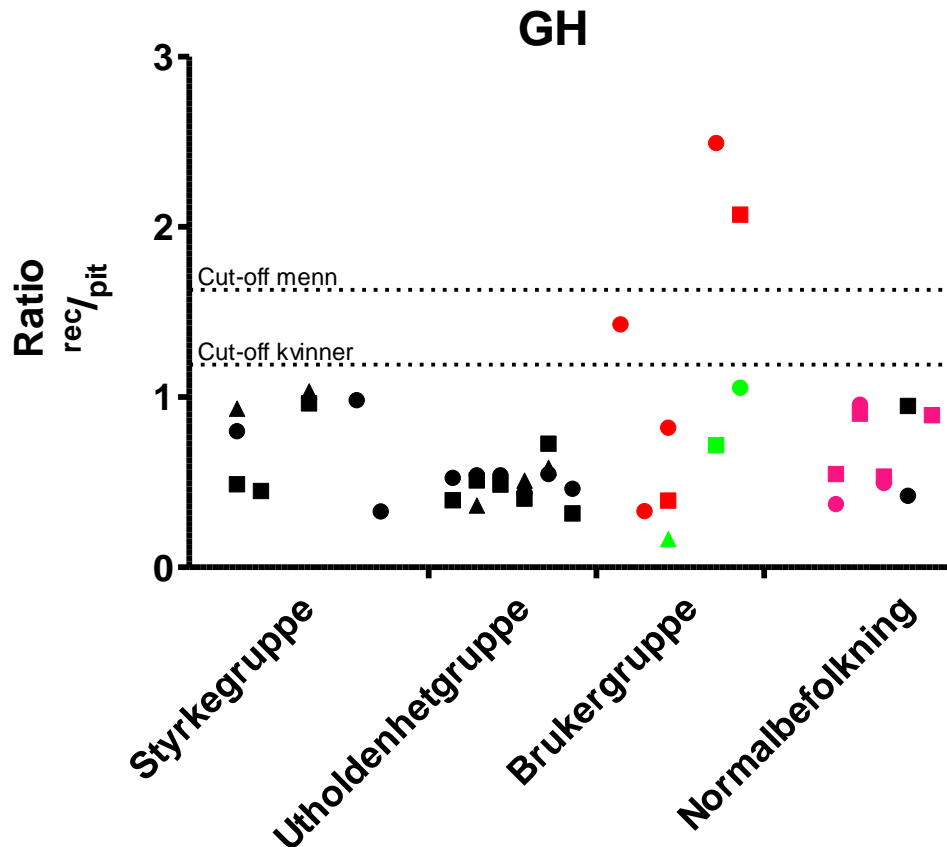
Figur 8:

Her ser vi alle prøvene plottet og delt inn etter grupper. Gjennomsnittet for alle målingene ble 232,0 ng/ml, med et standardavvik på 80,3 ng/ml. På grafen er det markert av for 2 og 3 standardavvik. 2 standardavvik tilsvarer at 95,4 % av en populasjon vil falle innenfor dette området, for 3 standardavvik er det 99,6 % som faller innenfor området.



Figur 9:

Her ser vi alle prøvene plotet og delt inn etter grupper. Gjennomsnittet for målingene ble 3,88  $\mu\text{g/l}$ , med et standardavvik på 1,32  $\mu\text{g/l}$ .



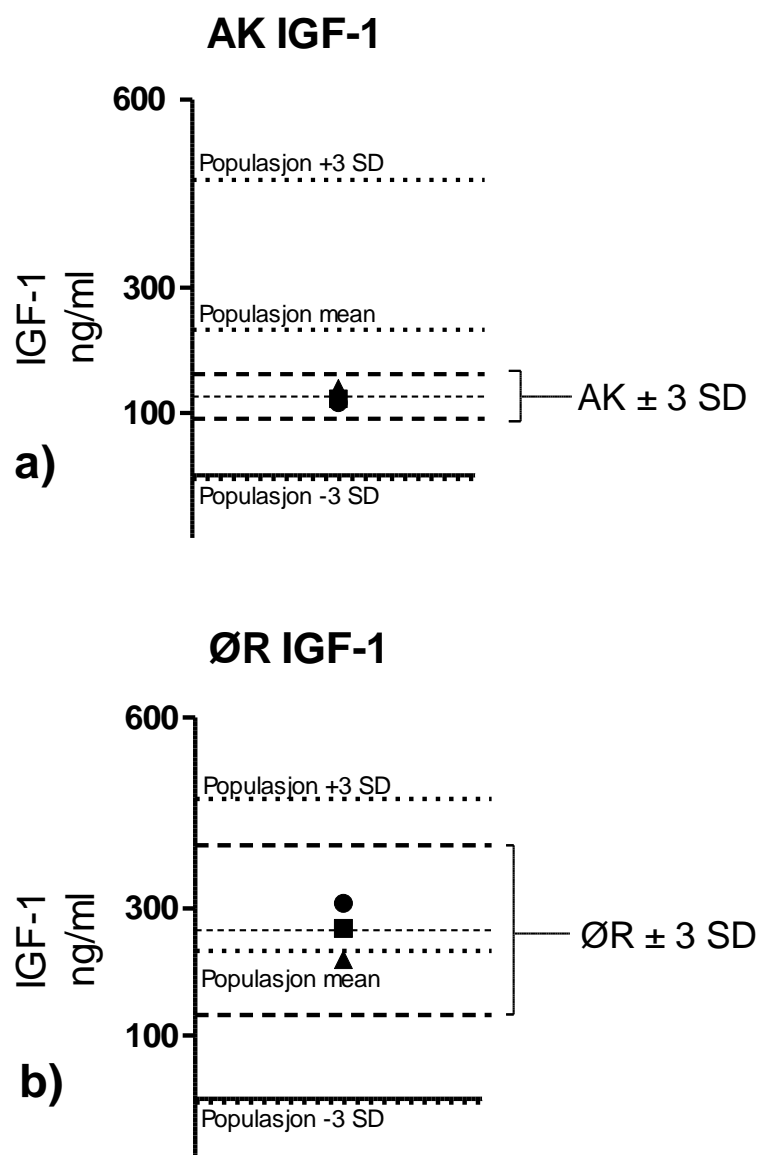
Figur 10:

Figuren viser resultatene fra analysen med direkte metoden for GH- deteksjon. Resultatene er ratioen av GH- konsentrasjonen mellom rekombinant og endogent produsert GH. Dette er screeninganalyse, så det er Kit 1 som er brukt. For Kit 1 er cut-off satt til 1,63 for menn og 1,19 for kvinner, som kommer fra WADA guidelines [57]. Det er mange som ikke har sine ratioer plotet, de kom under kvantifiseringsgrensen for enten rec eller pit konsentrasjonen. Disse prøvene defineres som negative på grunn av lav konsentrasjon og stor usikkerhet i beregningen av ratio, selv om den teoretisk sett kan bli høy.

Vi ser at vi har fått to prøver som kommer over cut-off, som vil si at de er positive, i henhold til gjeldende kriterier. Det er prøver fra to brukere, som begge hadde tatt GH samme dag som prøven ble avlagt. Det er fire prøver fra brukere som er avlagt mens de brukte dopingmidler, men ikke har kommet over cut-off. MA1, MA2 og SS1 sine prøver (de tre røde under cut-off for kvinner) hadde veldig lavt nivå av både rec og pit, så vidt over kvantifiseringsgrensen. AE1 (rød mellom cut-off grensene) hadde høye verdier av både rec og pit.

### 3.2.5. Individuelle profiler:

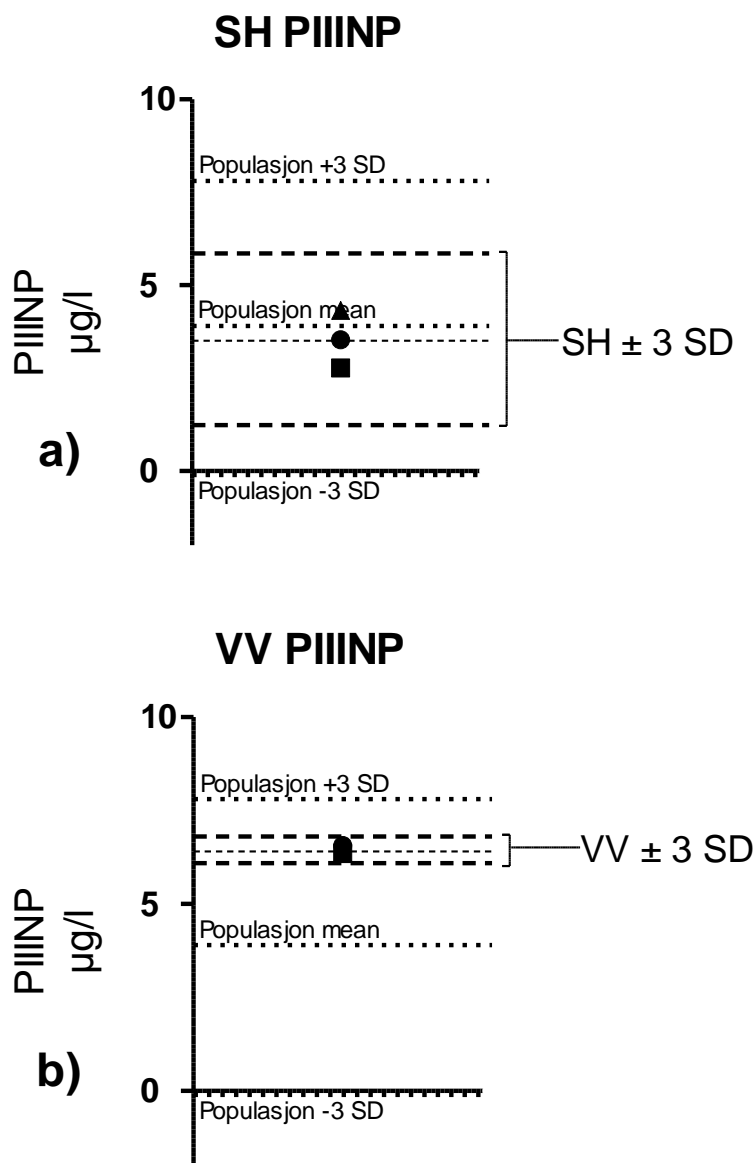
For å se på individuelle profiler har vi sett på enkelte av utøverne i styrkegruppen og utholdenhetsgruppen, som vi har tre prøver fra. Det er valgt en utøver med lite standardavvik og en utøver med stort standardavvik for de forskjellige stoffene. Så er alle de tre prøvene fra hver utøver plotet inn i en graf og markert  $\pm$  tre standardavvik. Det er også lagt inn  $\pm$  tre standardavviket for alle forsøkspersonene (populasjon) fra figur 9 og 10.



Figur 11:

Her ser vi AK fra styrkegruppen som har et lavt standardavvik og ØR også fra styrkegruppen men med et høyt standardavvik. Selv om ØR har et høyt avvik på  $\pm 133$  ng/ml for  $\pm 3$  SD, så

blir området hans mye mindre enn populasjonens avvik på  $\pm 241$  ng/ml. For AK er  $\pm 3$  standardavviket så lite som  $\pm 36$  ng/ml.



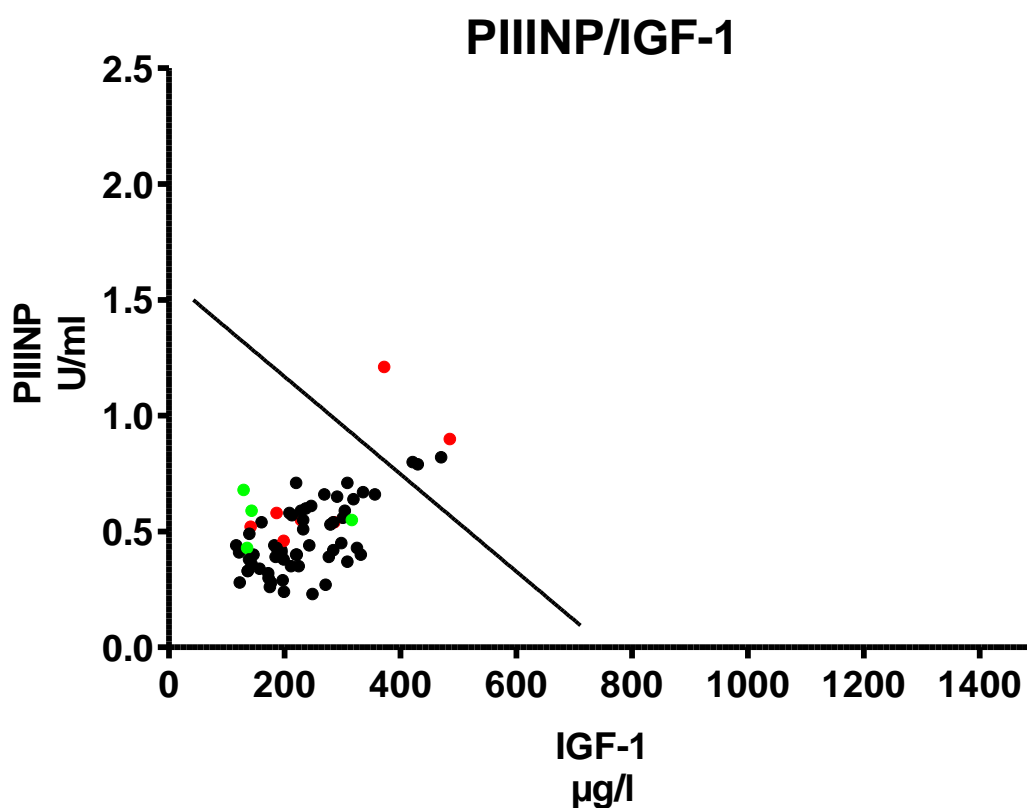
Figur 12:

Her ser vi SH fra utholdenhetsgruppen med et høyt standardavvik og VV fra styrkegruppen med veldig lavt standardavvik. SH med et høyt standardavvik har et  $\pm 3$  SD på  $\pm 2,3$   $\mu\text{g/l}$ , og VV med et lavt har  $\pm 0,349$   $\mu\text{g/l}$ . Selv med høyt standardavvik kommer SH godt innenfor grensene til populasjonen. Populasjonen har et  $\pm 3$  standardavvik på 3,95  $\mu\text{g/l}$ . For VV som ligger veldig høyt i forhold til populasjonen, har han etter tre prøver et veldig smalt normalområde på grunn av liten variasjon mellom prøvene han har avgitt.



### 3.2.6. Utviklingen av en dopingtest:

For å utvikle en dopingtest undersøkte GH-2000 gruppen etter hvilke to markører, av de åtte markørene de studerte, som gav den beste differensiering. Ved å plote IGF-1 mot PIIINP fikk de fullstendig separering av prøvene fra de som hadde fått GH og de som hadde fått placebo [58]. I figur 13 er våre resultater for IGF-1 og PIIINP plottet mot hverandre. For å få samme skala som GH-2000 brukte i artikkelen, måtte vi konvertere PIIINP resultatene fra ng/ml om til U/ml. Det ble gjort ved hjelp av en omregningsfaktor på 8 [59].



Figur 13:

Her har vi fått en separering i to grupper. De to prøvene til høyre for streken, som er fra brukere, er de samme to som ble positive i analysen med direkte metoden av GH. De tre svarte prikkene er fra VV i styrkegruppen, som har ligget høyt på både IGF-1 og PIIINP verdiene. På analysen av GH, hadde han så lave konsentrasjoner at de kom under kvantifiseringsgrensen for alle tre prøvene. For de tre brukerprøvene (røde prikker) som er til venstre for streken, er resultatet diskutert i diskusjonen av brukergruppen, punkt 4.2.3.

## 4. Diskusjon:

### 4.1. Mulige feilkilder:

Ved en slik studie er det en del mulige feilkilder som kan påvirke resultatene. GH har store individuelle variasjoner og i løpet av en dag varierer konsentrasjon også mye i hver enkelt person på grunn av utskillelse i pulser. I enkelte andre studier har de etterstrevet å ta prøvene til samme tidspunkt hver dag for hver enkelt forsøksperson, for å minimere denne variasjonen. I denne studien har ikke dette blitt gjort, men det er ikke en ulempe. Dopingprøver blir tatt til forskjellige tider av døgnet og vil også påvirkes av døgnvariasjonene i hvert enkelt utøver. Det å få med denne variasjonen i studien kan også gi mer informasjon om hvor store variasjonene kan være i hver enkelt person, noe som er viktig i utarbeidelse av individuelle profiler. GH konsentrasjonen påvirkes også av stress og trening. Derfor ble alle forsøkspersonene bedt om å sitte rolig i 10 minutter før blodprøven ble tatt.

Stabiliteten til stoffene er viktig å ta hensyn til under prøvetaking og oppbevaringen av prøvene. Det ideelle er å sentrifugere prøvene rett etter at koagulasjonen er ferdig og fryse prøven frem til analysen skal utføres. I en studie så de på oppbevaringsbetingelsene for prøvene og hvordan IGF-1 og PIIINP konsentrasjonene ble påvirket [56]. Prøvene ble enten satt i romtemperatur eller ved 4 °C i opptil 120 timer, før de ble sentrifugert og frosset. De fant at IGF-1 konsentrasjonen sannsynligvis ikke ble påvirket av å stå i romtemperatur, og sentrifugeringstidspunktet var heller ikke avgjørende for konsentrasjonen. For PIIINP fant de en økning i konsentrasjon på 6,5- 7,0 % per dag når prøven ble lagret som koagulert fullblod, før den ble sentrifugert og frosset [56]. I vår studie var det én prøve i styrkegruppen som ikke ble sentrifugert før etter 28 timer (se kommentar til figur 5a) og hadde fått en unormalt høy verdi. Denne prøven ble derfor ikke tatt med i beregningene for PIIINP, men for IGF-1 ble resultatene brukt.

Stabiliteten til prøvene kan også påvirkes av gjentatte fryse- og tineprosesser når analysene skal gjennomføres. Alle prøvene ble derfor delt opp i flere rør når de ble frosset og ved analysene ble ett nytt rør tint, såfremt det var nok serum tilgjengelig. Det gjør at det blir så få som mulig fryse- og tineprosesser, og minst mulig degradering av prøven.

Denne masteroppgaven er starten på denne studien av individuelle profiler for GH- doping. På sikt vil forsøkspersonene i studien avlegge flere prøver, og til sammen avgi mellom 6-8

prøver hver. Det vil si at tallgrunnlaget for denne masteroppgaven derfor er mindre enn ønskelig, med bare to og tre prøver fra de fleste forsøkspersonene. Men som man ser av resultatene i figur 11 og 12, så gir tre prøver allerede et mye smalere grenseområde for den individuelle utøver jamført med et populasjonsbasert normalområde.

## 4.2. Prøvene:

### 4.2.1. Styrkegruppen:

I styrkegruppen er det store variasjoner mellom forsøkspersonene. De store variasjonene kan skyldes at aktiviteten de driver med er veldig eksplosiv og gir en høy belastning på kroppen. I perioder med høy belastning vil de utskille mer GH som vil gi høyere nivå av IGF-1 og PIIINP over tid [60]. Selv om GH konsentrasjonen til de fleste i styrkegruppen er veldig lav når prøvene ble tatt, så har de høye verdier for IGF-1 og PIIINP. At nivåene av disse markørene er høye selv om konsentrasjonen av GH er svært lav, kan skyldes det faktum at halveringstid til markørene er så mye lengre enn GH. Markørene vil derfor ikke endres i løpet av kort tid. Variasjonene mellom utøverne kan i tillegg til de individuelle variasjonene, også skyldes at utøverne legger opp til ulike treningsperioder der treningen varierer mye i belastning.

VV ligger høyt i verdi på både IGF-1 og PIIINP, men har lave konsentrasjoner av GH. For alle målingene har han lite variasjon, den mest sannsynlige forklaringen er at disse høye verdiene er normale for han, og viser hvor store interindividuelle variasjoner det kan være.

### 4.2.2. Utholdenhetsgruppen:

Utholdenhetsgruppen er gruppen med minst variasjon mellom de forskjellige forsøkspersonene, både når det gjelder IGF-1, PIIINP og GH- ratio. Alle i gruppen er langrennsløpere som driver mye utholdenhetstrening. Denne type trening er ikke så eksplosiv og belastende som treningen styrkegruppen driver med, og vil trolig ikke gi de samme svingningene i GH- sekresjon [60].

### 4.2.3. Brukergruppen:

Vi ser av resultatene for IGF-1 og PIIINP i de forskjellige gruppene, at variasjonene mellom personene er betydelige og variasjonene er ikke begrenset til en spesiell gruppe. I brukergruppen vil vi forvente å få store variasjoner i og med at de avlegger prøver både når de er av og på rekombinant GH. MA og AE er her et unntak, de har variasjoner som er mye lavere enn forventet.

For MA er variasjonen liten, selv om tre av prøvene var fra perioder han brukte GH-dopingmiddel og en fra periode uten. Ved de første to prøvene har MA lave konsentrasjoner for GH og gjennomsnittlige verdier for IGF-1 og PIIINP. En mulig forklaring på dette kan være den korte halveringstiden som GH har i kroppen. Det kan gjøre at dopingmiddelet han har injisert, vil være borte eller sunket til et lavt nivå, før han har avlagt prøve hos oss om ettermiddagen. Dette selv om han tok siste dose i løpet av natten eller tidlig på morgenen før prøvetaking. Ved den nest siste prøve til MA, da han ikke brukte noe GH-dopingmiddel var det små endringer for IGF-1 og PIIINP, mens GH konsentrasjonen var litt økt. Det kan skyldes at den endogene produksjonen av GH har vært undertrykket etter langtidsbruk av GH-dopingmidler, men er nå på vei tilbake. Ved den siste prøven (bare analysert for IGF-1) til MA har han økt IGF-1. Økningen er ikke større enn at han kommer opp til gjennomsnittet for populasjonen, men for han er det en tydelig økning.

AE har også en lav variasjon i prøvene sine. Ved den første prøven han avga hadde han en høy konsentrasjon av både 20 og 22 kDa isoformen av GH. En mulig årsak til dette er at det illegalt produserte GH-midlet han brukte, kjøpt over internett, kan inneholde begge isoformene. Det vil gjøre at han ikke får en ratio over cut-off grensen for direkte metoden, siden konsentrasjonen av begge isoformene vil øke ved bruk av preparatet. En annen mulig årsak kan være at preparatet han har brukt ikke er GH i det hele tatt og det høye nivået av både 20 og 22 kDa kan være det naturlige nivået. Ved den siste prøven, da han var "ren", har han veldig lave konsentrasjoner av både GH, IGF-1 og PIIINP. Det tyder på at den endogene produksjonen har vært hemmet, og ikke har kommet i gang igjen etter en GH kuren.

EDA og KØ har en prøve hver som er positiv med direkte metoden, og både IGF-1 og PIIINP verdiene er høye for den samme prøven. De har tatt GH før de positive prøvene og KØ hadde tatt to doser samme dag som prøven ble avlagt. På de andre prøvene som var negative hadde de ikke brukt GH-dopingmidler på en stund, og nivåene var lavere.

For å oppsummere brukergruppen, ser vi at de som har brukt GH fra Novo Nordisk (EDA og KØ), har hatt effekt av preparatet og viser store forskjeller i prøvene med og uten GH. For MA og AE som har brukt preparater kjøpt over internett som har usikkert innhold, ser vi ikke like tydelige forskjeller med og uten GH. Det kan tyde på at preparatene enten ikke inneholder det de påstås å gjøre eller at det er store individuelle forskjeller med hensyn til responsen fra rhGH.

#### 4.2.4. Normalbefolkning:

Blant normalbefolkningen var det en del variasjon mellom forsøkspersonene, men hver enkelt hadde relativt liten individuell variasjon. Det var tre stykker i gruppen som hadde lav GH-konsentrasjon på begge prøvene sine, alle disse var blant de eldre i gruppen og det er naturlig at de har lavere GH-konsentrasjon, da sekresjonen synker med økt alder. Dette gjenspeiles også i IGF-1 og PIIINP konsentrasjonene deres, der de ligger lavest i gruppen og godt under gjennomsnitt for hele populasjonen. De øvrige i normalbefolkningsgruppen har helt normale variasjoner og skiller seg ikke ut. De viser at det er naturlig med individuelle variasjoner som burde tas hensyn til ved en doping test.

#### 4.2.5. Individuelle profiler:

Bruk av individuelle profiler innen antidopingarbeid har hittil ikke vært vanlig. Det er først nå nylig, med innføringen av biologisk pass for hver utøver, at dette er blitt aktuelt. Bruken av individuelle profiler vil senke grenseverdien, som man kan se ut fra resultatene i figur 11 og 12.

Vi ser på grafene for alle de individuelle verdiene at nesten alle kommer innenfor tre standardavvik, som tilsvarer 99,6 % av en populasjon (figur 8 og 9). Men dette standardavviket er relativt stort, og av de prøvene som ble positive for GH- direkte metoden, kommer bare en av de over grensen for tre standardavvik i IGF-1 grafen og den andre over grensen i PIIINP grafen. Hvis vi hadde kunnet legge inn personlige grenser for PIIINP og IGF-1 for disse to prøvene, ville de høyst sannsynlig kommet over grensen for både IGF-1 og PIIINP. Dette lot seg imidlertid ikke å gjøre, siden vi ikke hadde flere enn én GH- fri prøve fra hver av brukerne til å lage et grenseområde ut i fra.

Med statistiske tester fant vi også at det var signifikante forskjeller mellom gjennomsnittene for PIIINP mellom en del av gruppene. Det viser at det er store interindividuelle variasjoner som man må ta hensyn til, og ved bruk av individuelle profiler blir dette ivarettatt.

For å definere hvor stor grensen skal være i en individuell profil har vi brukt  $\pm 3$  standardavvik. Dette er enkel metode for å definere et grenseområde og det vil være ønskelig å bruke en annen metode når man får flere prøver fra hver forsøksperson. Til å definere grenseområde i de biologiske passene, brukes Bayes' teorem, som er en kjent statistisk metode. Ved å bruke denne metoden starter man med et grenseområde som er ganske bredt, tilnærmet lik det som er vanlig for en populasjon. Etter hvert som en utøver avgir flere prøver, vil grenseområdet bli mindre og tilpasses den enkelte utøvers sine normalområder. Denne statistiske metoden vil følgelig være veldig aktuell i denne sammenheng, når flere prøver er samlet inn.

Som forventet ser vi at individuelle profiler vil snevre inn grenseområdene for stoffene og den metoden vil være utelukkende bedre å bruke enn grenseområder fra en populasjon.

### 4.3. Utviklingen av en dopingtest:

#### 4.3.1. PIIINP / IGF-1 grafen:

I figur 9 og 10, med de individuelle målingene for IGF-1 og PIIINP, får vi ikke noe tydelig skille mellom de som er brukere av GH- dopingmidler og de som ikke gjøre det eller er i en av kontrollgruppene. Ved å sette sammen resultatene i samme graf, som i figur 14, får vi et tydeligere skille mellom gruppene. Det viser at å kombinere resultatene fra to markører skiller gruppene dopet/ikke-dopet bedre enn det de enkelte markørene gjør hver for seg.

I denne studien har vi med en brukergruppe som har et personlig bruk av dopingmidler og som selv velger hvilke preparater og hvor store doser de tar. Dette fører til at vi ikke klarer å få et like godt skille som andre studier har klart [58]. I de andre studiene har de mer kontrollerte doseregimer, der forsøkspersonene skal ta dosene til samme tid hver dag, og de har tydelig skille mellom gruppene som får GH og de som får placebo. De bruker også friske frivillige personer, som ikke har brukt noen form for dopingmidler i tiden før studien. Da brukerne i denne studien har et aktivt forbruk vil de allerede være påvirket av

langtidseffektene av GH- bruk. Dette kan forklare de i brukergruppen som kommer i ”feil” gruppe i figur 14, selv om de har brukt dopingmidler.

#### 4.3.2. GH-2000:

GH-2000 gruppen utarbeidet metoden for dopinganalyse av GH med bruk av indirekte markører. De brukte en kombinasjon av markørene for å få et mye bedre skille mellom de som hadde fått GH administrert og de som hadde fått placebo. Til dette utviklet de en formel for hvert kjønn som var tilpasset toppidrettsutøvere og korrigerende for alder.

$$Menn = -6,586 + 2,905 * \log(PIIINP) + 2,100 * \log(IGF - 1) - 101,737/alder$$

$$Kvinner = -8,459 + 2,454 * \log(PIIINP) + 2,195 * \log(IGF - 1) - 73,666/alder$$

[10]

Da denne formelen ble utviklet brukte de kit fra Nichols, USA (IGF-1) og CIS, Frankrike (PIIINP) til å analysere prøvene [58]. Siden de forskjellige kitene på markedet ikke direkte gir sammenlignbare tall, har en viktig del av jobben til GH-2004 gruppen vært å finne omregningsfaktorer for de forskjellige kitene. Siden det i denne studien ikke ble brukt de samme kitene som av GH-2000 gruppen (fordi de ikke lenger er tilgjengelig), har vi prøvd å finne omregningsfaktorer for å kunne bruke formlene. For omregning av PIIINP, fra Orion til CIS, ble det publisert en ny artikkel 21. april 2010 fra GH-2004 gruppen der de hadde sammenlignet kitene og funnet en omregningsfaktor [61]. For omregning av IGF-1 fra Simens til Nichols finnes det ingen faktor ennå, men Simens kitet er blant de kitene GH-2004 jobber med å finne omregningsfaktorer for [62]. Det ble gjort forsøk på å finne en omregningsfaktor via andre kit som ble brukt i startfasen av denne studien, men det viste seg å gi utilfredsstillende resultat, på grunn av for lite data til å beregne en omregningsfaktor. Det ble derfor ikke mulig å bruke GH-2000 formelen på resultatene i denne studien.

## 5. Konklusjon:

I studien har vi målt konsentrasjonen av IGF-1, PIIINP og GH i prøvene fra forsøkspersoner fra fire ulike grupper. Vi har vist at det er til dels store forskjeller mellom forskjellige individer, i forhold til variasjonen sett for hver enkelt person over tid. Ved å bruke flere prøver fra samme person har vi fremstilt individuelle profiler. Selv om vi har hatt litt lite data, ser vi tydelig at bruken av individuelle profiler vil gjøre grenseområdene for markørene mindre enn ved bruk av grenseområder for en hel populasjon.

Ved å sette sammen resultatene fra IGF-1 og PIIINP målingene i samme graf får man et tydeligere skille mellom gruppene. Dette, sammen med bruken av GH-2000 formelen, vil være et nyttig verktøy i antidopingarbeidet for å avsløre de som misbruker GH.

Denne studien vil fortsette ved Norges laboratorium for dopinganalyser etter at denne masteroppgaven er ferdig. Det vil bli spennende å se det endelige utfallet av studien når flere prøver fra hver forsøksperson er avlagt, og mer datagrunnlag kan brukes til å finne grenseverdier og en omregningsfaktor. Da kan dataen også brukes i GH-2000 formelen.



## 6. Referanser:

1. Haug, E., P. Hemmersbach, and K. Birkeland, *Glimt fra idrettens dopinghistorie*. Tidsskrift for Den norske Lægeforening, 1999. **nr 17**(119): p. 2538-2540.
2. WADA. *A Brief History of Anti-Doping*. [cited 2010 13.01]; Available from: <http://www.wada-ama.org/en/About-WADA/History/A-Brief-History-of-Anti-Doping/>.
3. Holt, R.I.G., *Is human growth hormone an ergogenic aid?* 2009, Drug Testing and Analysis. p. 417.
4. ADN. *Virksomhet*. [cited 2010 18.01]; Available from: <http://www.antidoping.no/internett/antidoping-norge/virksomhet/>.
5. WADA, *The 2010 Prohibited list*. 2010: p. 1-9.
6. Sönksen, P.H., et al., *GH-2000 Final report*. 1999: London.
7. *Growth Hormone-2004 Project*. GH-2004 [cited 2010 04.05]; Available from: <http://www.gh2004.soton.ac.uk/>.
8. Erotokritou-Mulligan, I., et al., *Influence of ethnicity on IGF-I and procollagen III peptide (P-III-P) in elite athletes and its effect on the ability to detect GH abuse*. Clinical Endocrinology, 2009. **70**(1): p. 161-168.
9. Erotokritou-Mulligan, I., et al., *The Effect of Sports Injury on Insulin-Like Growth Factor-I and Type 3 Procollagen: Implications for Detection of Growth Hormone Abuse in Athletes*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2008. **93**(7): p. 2760-2763.
10. Holt, R.I., *Detecting growth hormone abuse in athletes*. Drug Testing and Analysis, 2009. **1**(9-10): p. 426-433.
11. Saugy, M., et al., *Human growth hormone doping in sport*. British Journal of Sports Medicine, 2006. **40 Suppl 1**: p. i35-9.
12. Bredehoft, M., W. Schänzer, and M. Thevis, *Quantification of human insulin-like growth factor-I and qualitative detection of its analogues in plasma using liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. **22**(477-485).
13. Saugy, M., N. Robinson, and C. Saudan, *The fight against doping: back on track with blood*. Drug Testing and Analysis, 2009. **1**(9-10): p. 474-478.
14. ADN. *Et "paradigmeskifte" i antidopingarbeidet*. [cited 2010 04.05]; Available from: <http://www.antidoping.no/internett/nyhetsarkiv/-et-paradigmeskifte-i-antidopingarbeidet/>.
15. Widmaier, E.P., H. Raff, and K.T. Strang, *Vander's Human Physiology: The mechanisms of body function*. 2006, McGraw-Hill: New York. p. 380-383.
16. Widmaier, E.P., H. Raff, and K.T. Strang, *Vander's Human Physiology: The mechanisms of body function*. 2006, McGraw-Hill: New York. p. 381.
17. Holt, R.I. and P.H. Sonksen, *Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport*. British Journal of Pharmacology, 2008. **154**(3): p. 542-56.
18. Holt, R.I.G., *Is human growth hormone an ergogenic aid?* Drug Testing and Analysis, 2009. **1**(9-10): p. 412-418.
19. Yakar, S., et al., *Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(13): p. 7324-7329.
20. Cuneo, R.C., et al., *The growth hormone deficiency syndrome in adults*. Clinical Endocrinology, 1992. **37**(5): p. 387-397.

21. Sharp, R., *Land of the Giants*. Growth Hormone & Igf Research, 2009. **19**(4): p. 291-293.
22. Cowan, D. and C. Bartlett, *Laboratory issues in the implementation of the marker method*. Growth Hormone & Igf Research, 2009. **19**(4): p. 357-360.
23. Guler, H.P., et al., *Insulin-like growth factors I and II in healthy man*. Acta Endocrinologica, 1989. **121**: p. 753-758.
24. Grahnen, A., et al., *Pharmacokinetics of recombinant human insulin-like growth factor I given subcutaneously to healthy volunteers and to patients with growth hormone receptor deficiency*. Acta Pædiatrica Supplement, 1993. **82**(391): p. 9-13.
25. Mauras, N., et al., *Recombinant human insulin-like growth factor I has significant anabolic effects in adults with growth hormone deficiency: studies on protein, glucose and lipid metabolism*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2000. **85**(9): p. 3036-3042.
26. Guler, H.P., J. Zapf, and E.R. Froesch, *Short-term metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor I in healthy adults*. The New England Journal of Medicine, 1987. **317**: p. 137-140.
27. Guha, N., P.H. Sönksen, and R. Holt, *IGF-1 abuse in sport: Current knowledge and future prospects for detection*. Growth Hormone & Igf Research, 2009. **19**(4): p. 408-411.
28. Berg, J.P. *Veksthormon (SML-artikkel)*. [cited 2010 08.05]; Available from: [http://www.snl.no/sml\\_artikkel/veksthormon](http://www.snl.no/sml_artikkel/veksthormon).
29. Kemp, S.F., J.L. Fowlkes, and K.M. Thraillkill, *Efficacy and safety of mecasermin rinfabate*. Expert Opinion on Biological Therapy, 2006. **6**(5): p. 533-538.
30. Crofton, P.M., et al., *Serum concentrations of carboxyl-terminal propeptide of type I procollagen, amino-terminal propeptide of type III procollagen, cross-linked carboxyl-terminal telopeptide of type I collagen, and their interrelationship in schoolchildren*. Clinical Chemistry, 1997. **43**(9): p. 1577-1581.
31. Niemelä, O., et al., *Purification and characterization of N-terminal propeptide of human type III procollagen*. The Biochemical Journal, 1985. **232**: p. 145-150.
32. Longobardi, S., et al., *Growth hormone (GH) effects on bone and collagen turnover in healthy adults and its potential as a marker of GH abuse in sports: a double blind, placebo-controlled study*. The GH-2000 Study Group. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2000. **85**(4): p. 1505-12.
33. Risteli, J., et al., *Rapid Equilibrium Radioimmunoassay for the Amino- Terminal Propeptide of Human Type III Procollagen*. Clinical Chemistry, 1988. **34**(4): p. 715-718.
34. Bhasin, S., et al., *N-Terminal Propeptide of Type III Procollagen as a Biomarker of Anabolic Response of Recombinant Human GH and Testosterone*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2009. **94**(11): p. 4224-4233.
35. McHugh, C.M., et al., *Challenges in detecting the abuse of growth hormone in sport*. Clinical Chemistry, 2005. **51**(9): p. 1587-93.
36. Fainaru-Wada, M. and L. Williams, *Game of shadows: Barry Bonds, BALCO, and the Steroids Scandale that Rocked Professional Sports*. 2006: Gotham Books. 1-332.
37. Rickert, V.I., et al., *Human growth hormone: A new substance of abuse among adolescents?* Clinical Pediatrics, 1992. **31**: p. 723-726.
38. *Straffeloven, 14de kapitel §162b*, Lovdata: <http://www.lovdata.no/all/tl-19020522-010-018.html#162b>.
39. *Steroid.com*. 2010; Available from: <http://www.steroid.com/>.
40. *World Anti-Doping Agency*. 2010; Available from: <http://www.wada-ama.org/>.
41. *Antidoping Norge*. 2010; Available from: <http://www.antidoping.no/>.

42. Steroider.net. 2010; Available from: <http://www.steroider.net/>.
43. Rennie, M.J., *Claims for the anabolic effects of growth hormone: a case of the Emperor's new clothes?* British Journal of Sports Medicine, 2003. **37**: p. 100-105.
44. Salomon, F., et al., *The effects of treatment with recombinant human growth hormone on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency.* The New England Journal of Medicine, 1989. **321**: p. 1797-1803.
45. Jørgensen, J.O., et al., *Beneficial effects of growth hormone treatment in GH-deficient adults.* Lancet, 1989. **1**: p. 1221-1225.
46. Graham, M.R., et al., *Physical Effects of Short-Term Recombinant Human Growth Hormone Administration in Abstinent Steroid Dependency.* Hormone Research, 2008. **69**: p. 343-354.
47. Increlex. Felleskatalogen [cited 2010 03.05]; Available from: <http://www.felleskatalogen.no/>.
48. IGF-1 2012 Project. GH-2004 [cited 2010 04.05]; Available from: <http://www.gh2004.soton.ac.uk/toppage2.htm>.
49. Wu, Z., et al., *Detection of doping with human growth hormone.* Lancet, 1999. **353**(9156): p. 895.
50. Simens Healthcare Diagnostics, Immulite 2500, IGF-1, in Assay Insertion. 2008. p. 1-8.
51. Insulinlignende vekstfaktor 1 i frosset serum, in Laboratorieboka. 2003, Oslo Universitetssykehuset, Aker, Hormonlaboratoriet.
52. Orion Diagnostica, UniQ PIIINP RIA, in Assay Insertion. 2009. p. 1-16.
53. CMZ, hGH LIA KIT 1, in Assay Insertion. 2009. p. 1-4.
54. WADA. *International Standard for Laboratories.* 2009 [cited 2010 28.04]; Available from: [http://stage.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-IS-Laboratories/WADA\\_Int.Standard\\_Laboratories\\_2009\\_EN.pdf](http://stage.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/WADA_Int.Standard_Laboratories_2009_EN.pdf).
55. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse.* 2004, Fagbokforlaget: Bergen. p. Kapitell 28.
56. Holt, R.I., et al., *A determination of the pre-analytical storage conditions for insulin like growth factor-I and type III procollagen peptide.* Growth Hormone & Igf Research, 2009. **19**(1): p. 43-50.
57. Dehnes, Y., *PD 61 Analyse av hGH-prøver på AutoLumat LB 953.* Elektronisk Kvalitetshåndbok K.1.8.3.3.1.9, 2009: p. 1-4.
58. Powrie, J.K., et al., *Detection of growth hormone abuse in sport.* Growth Hormone & Igf Research, 2007. **17**(3): p. 220-6.
59. Cisbio Bioassays, PIIIP, in Assay Insertion. 2010. p. 1-6.
60. Rigamonti, A.E., et al., *Growth hormone abuse: methods of detection* Trends in Endocrinology & Metabolism, 2005. **16**(4): p. 160-166.
61. Guha, N., et al., *Serum Insulin-Like Growth Factor-I and Pro-Collagen Type III N-Terminal Peptide in Adolescent Elite Athletes: Implications for the Detection of Growth Hormone Abuse in Sport.* Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, June 2010 ahead of print. **95**(6): p. 0000-0000.
62. Holt, R.I.G., *E-post utveksling med Holt, R. I. G.* 2010.